

科研中心形态学实验技术研发部

提供细胞成像、材料形貌表征、组织脱水、包埋、切片、染色、扫描等服务

激光共聚
焦显微镜

全自动全封
闭脱水机

HistoStar 包
埋工作站

切片机

TissueFAXS
Plus 全景组织
细胞定量分析
系统

负责人：孙 友 15056859175
管理员：严文静 15692108069
缪 丹 15605181877

网址：

<https://kyzx.gmu.cn/jsyfb/xtxsyjsyfb.htm>

激光共聚焦显微镜



仪器基本信息及功能应用：

- 1、型号：ZEISS LSM880
- 2、房间号：第五实验楼212
- 3、管理人员：严文静
- 4、功能应用：

LSM880蔡司激光共聚焦显微镜可以对组织或细胞内部的荧光标记信号进行清晰成像；在细胞、亚细胞水平观察组织或细胞的形态学变化和内部微细结构；对样品进行断层扫描并重构和分析组织或细胞的三维空间结构；快速拍摄时间序列图像捕捉动态过程；大图拼接重构大面积高分辨率样品全貌；观察重要离子浓度的变化；对特定区域或结构进行光操作和分子功能学分析等。



全自动全封闭脱水机



HistoStar 包埋工作站



HM325全自动转轮式切片机



NX50冷冻切片机



HM525冷冻切片机



TissueFAXS Plus 全景组织细胞定量分析系统

激光共聚焦显微镜

1.1

激光共聚焦显微镜的原理

1.2

激光共聚焦显微镜的操作及注意事项

1.3

激光共聚焦显微镜的应用及例子分析

激光共聚焦的原理

激光 扫描 共聚焦 显微镜



光源



成像方式



最重要技术

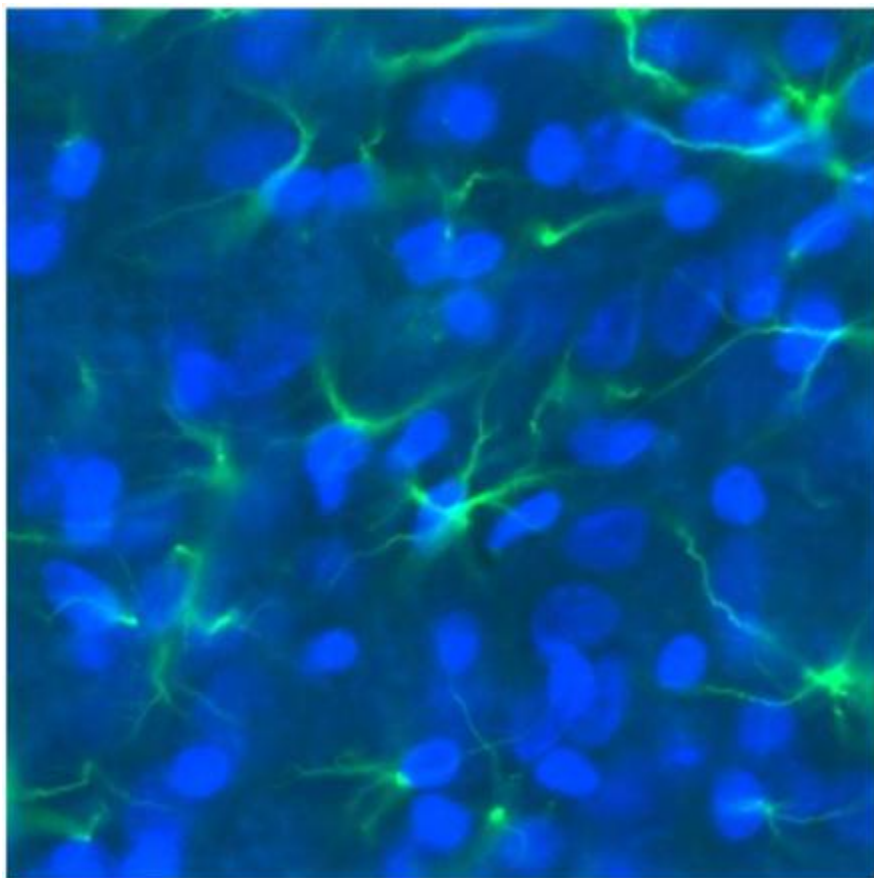


本质

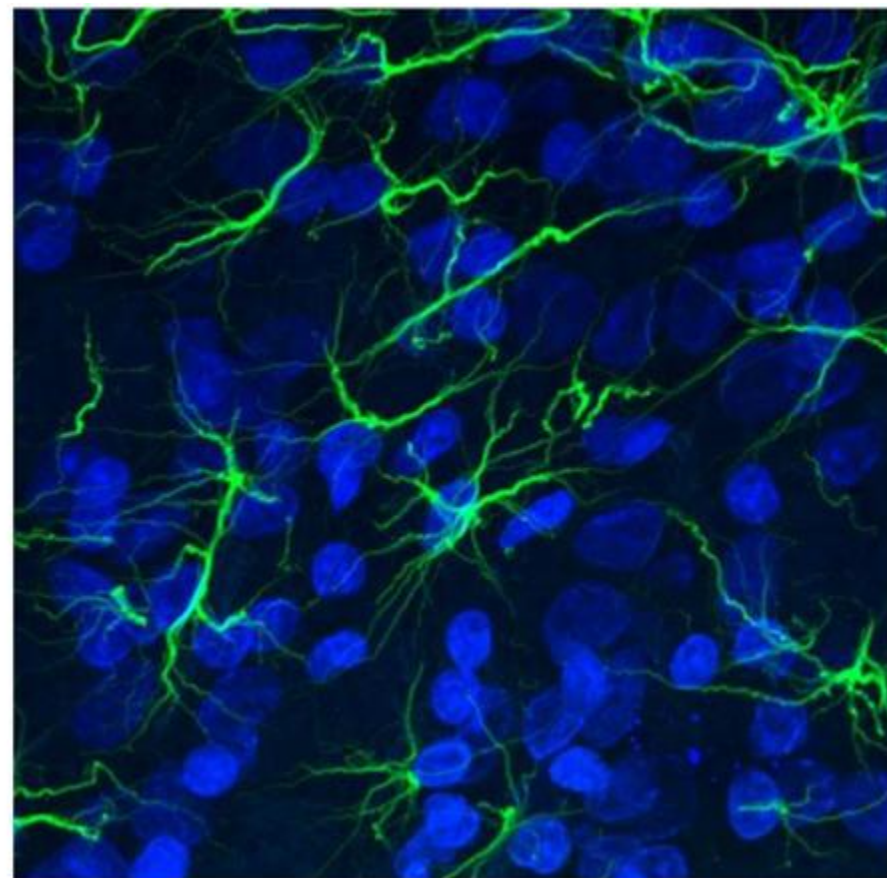


※焦距的共轭平面添加针孔用于滤掉非焦平面的信号※

激光共聚焦的原理



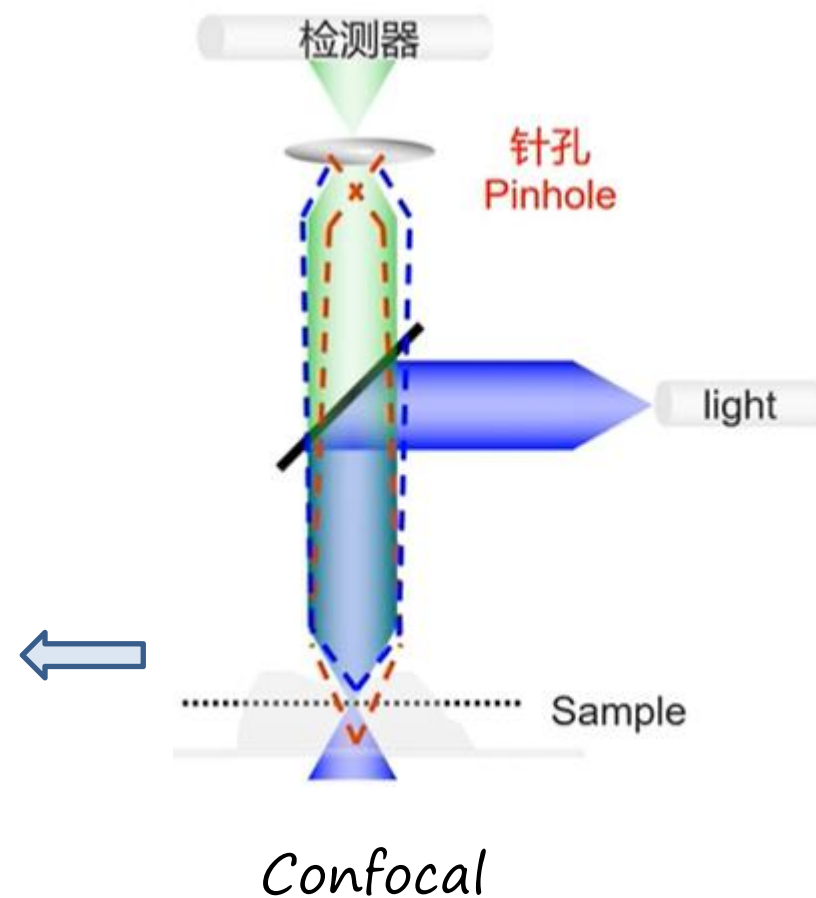
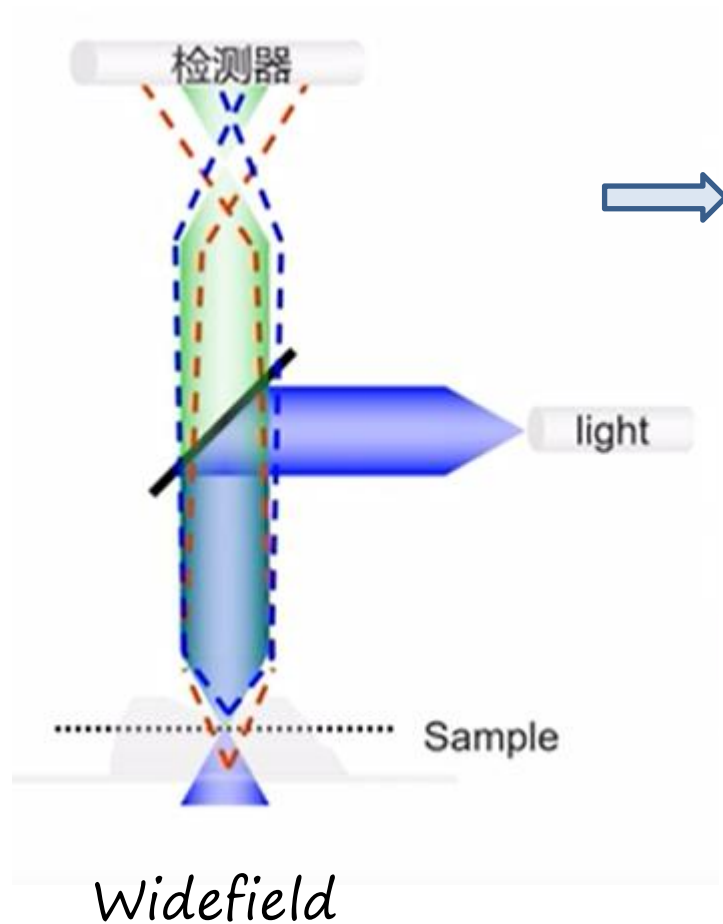
Widefield



Confocal

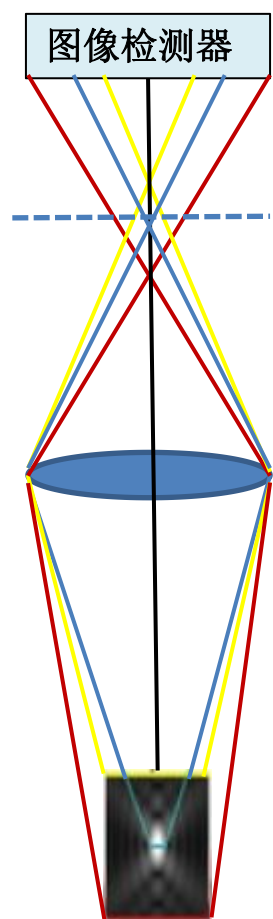
激光共聚焦的原理

利用针孔与焦点位置共轭，过滤杂散光



激光共聚焦的原理

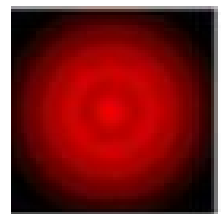
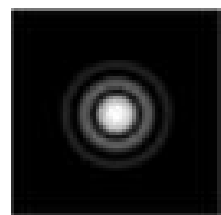
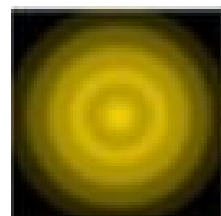
WF显微镜成像



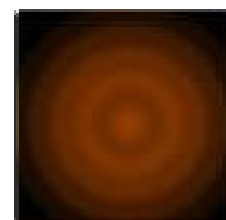
焦平面

MIC

样本



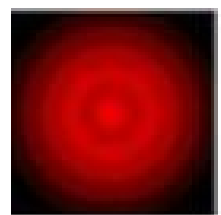
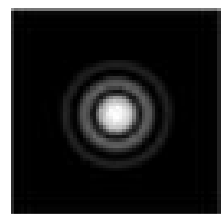
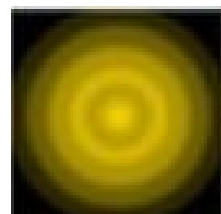
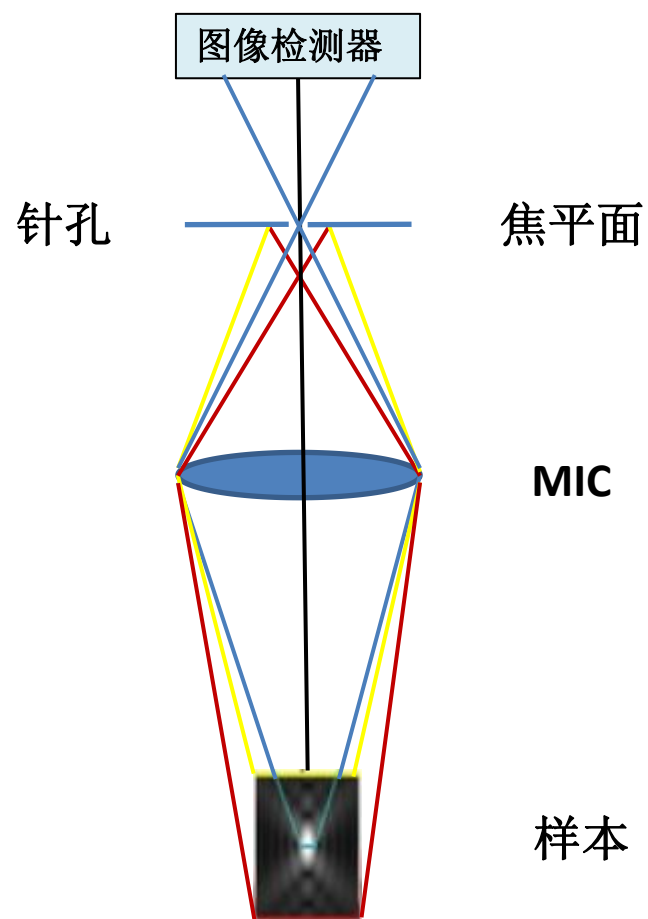
样本发出荧光



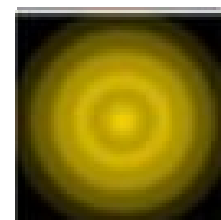
最终得到的荧光图像

激光共聚焦的原理

共聚焦显微镜成像

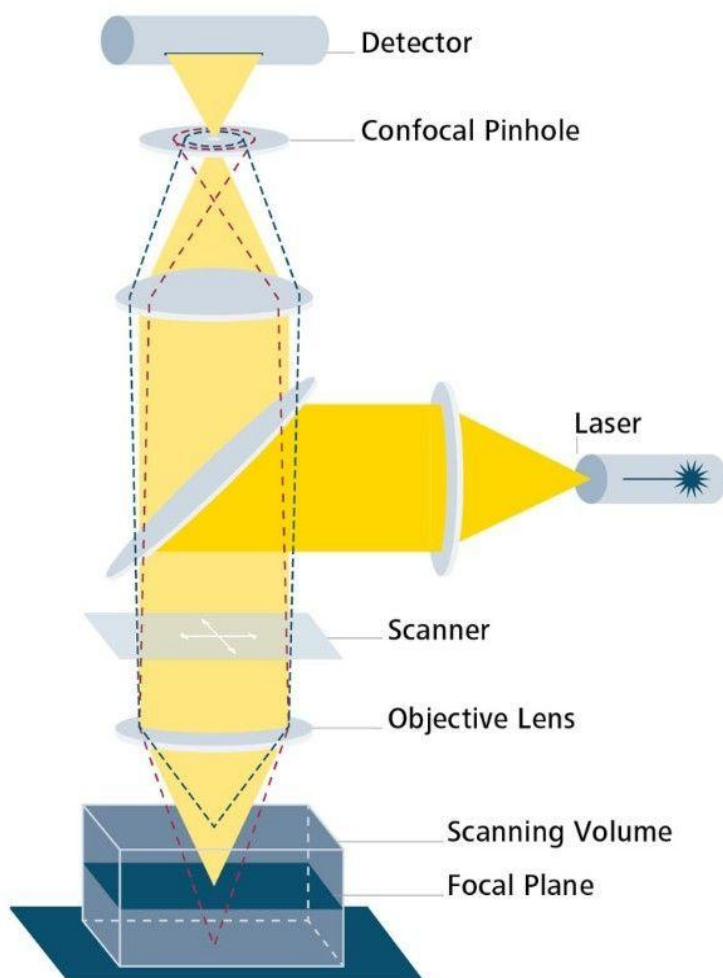


样本发出荧光



最终得到的荧光图像

激光共聚焦的原理

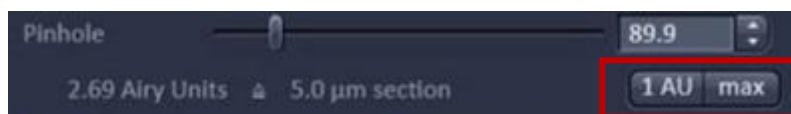


在共轭平面增加针孔，屏蔽非焦平面信号

屏蔽非焦平面信号

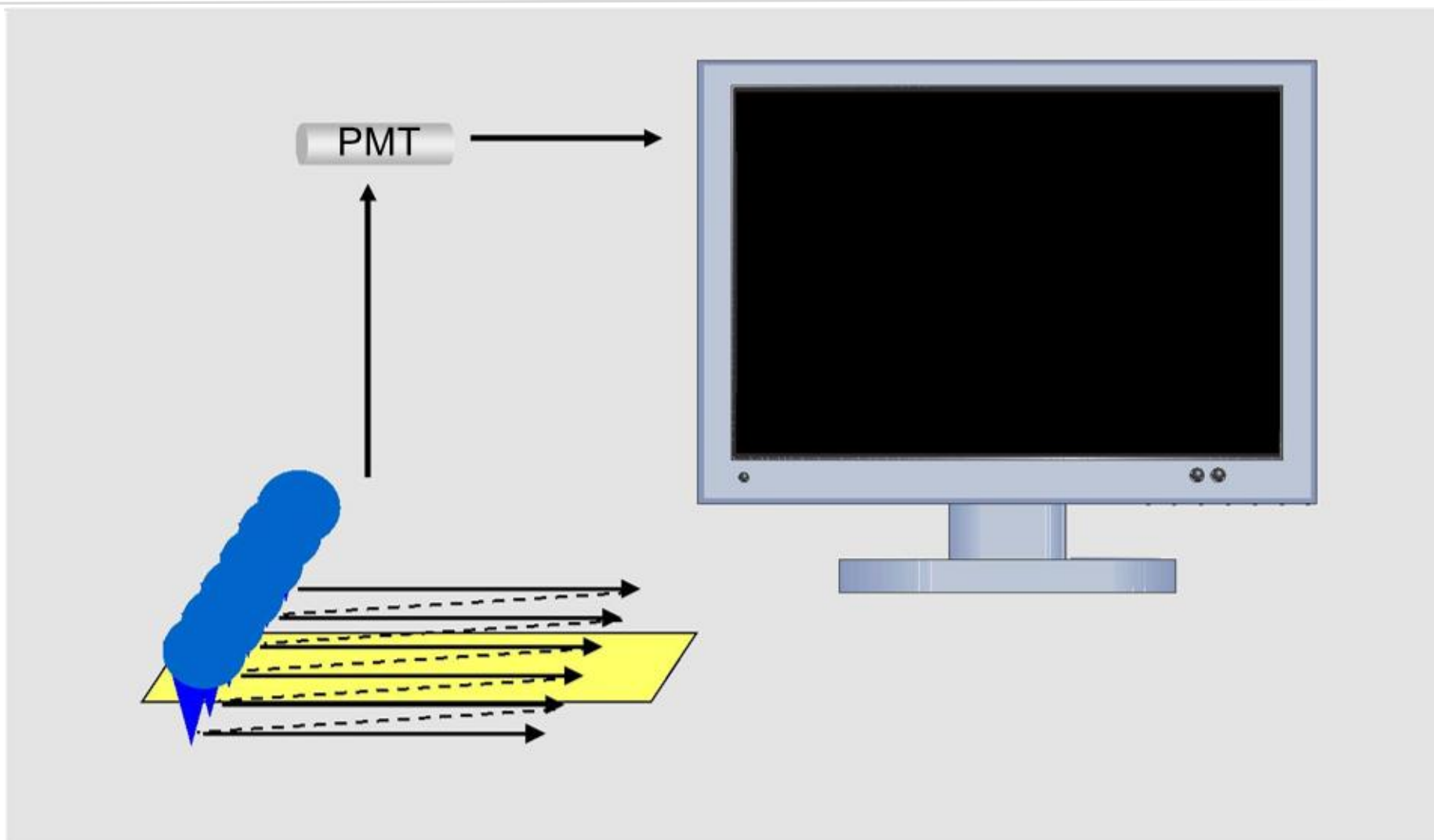
- 针孔增加，光通量增加，非焦平面信号增加
- 针孔减小，光通量减小，非焦平面信号减小

一般情况，针孔大小为1AU



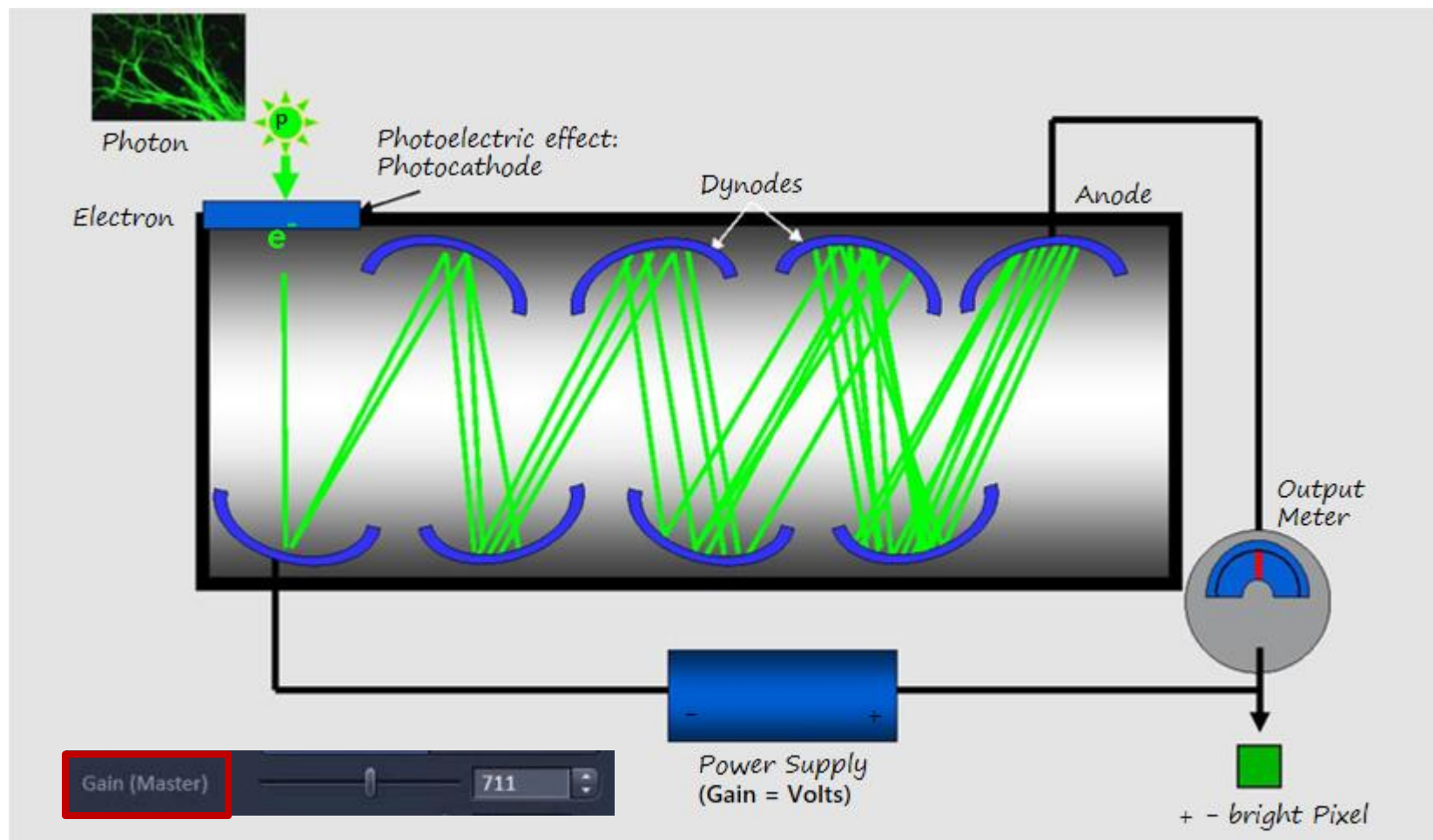
Confocal Imaging

From Point to Image

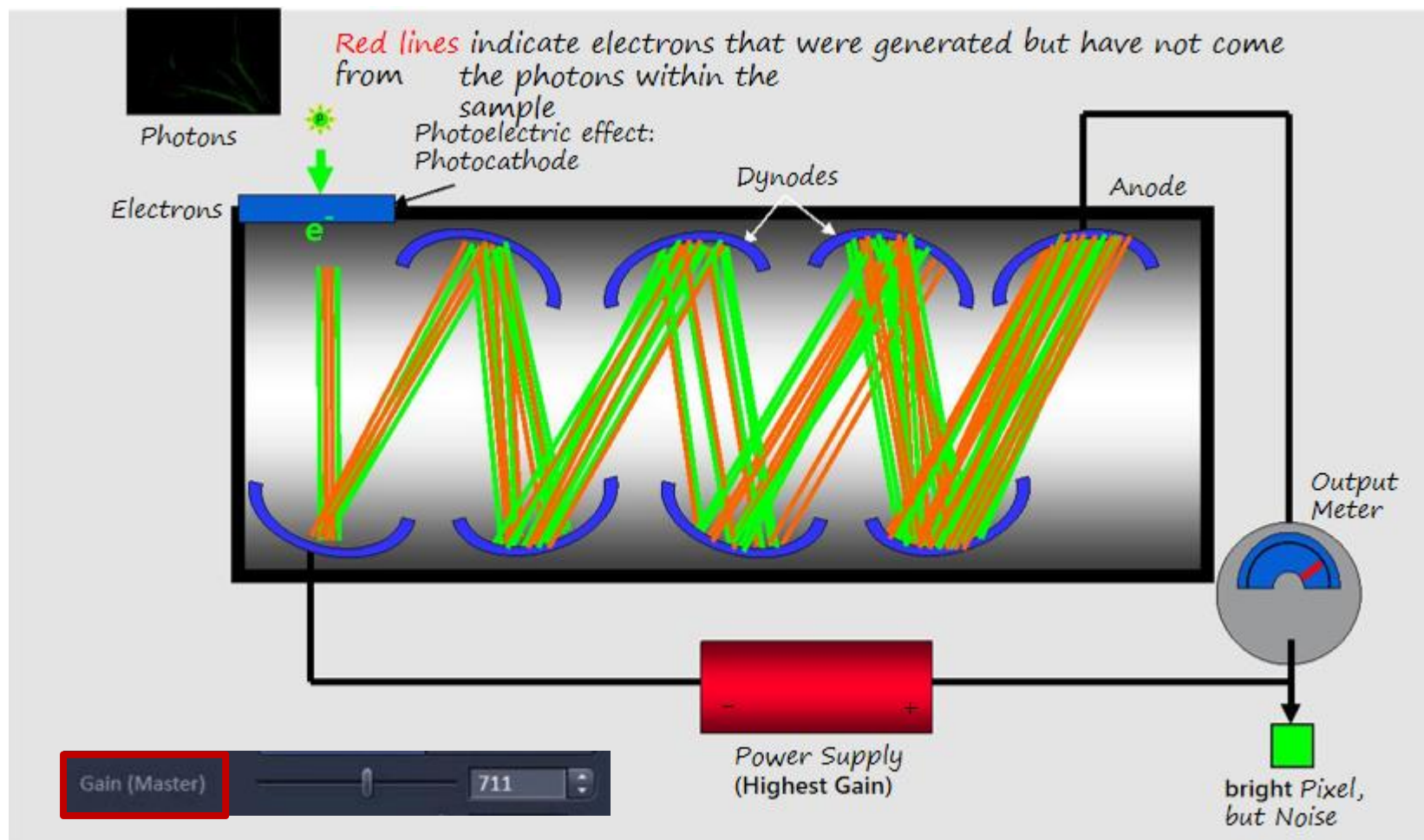


检测器 -- Photomultiplier Tube / PMT Detectors (光电倍增管)

How does a PMT work?



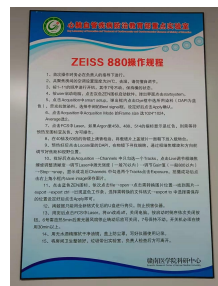
检测器 -- Photomultiplier Tube / PMT Detectors



- 1.1 激光共聚焦显微镜的原理
- 1.2 激光共聚焦显微镜的操作及注意事项
- 1.3 激光共聚焦显微镜的应用及例子分析

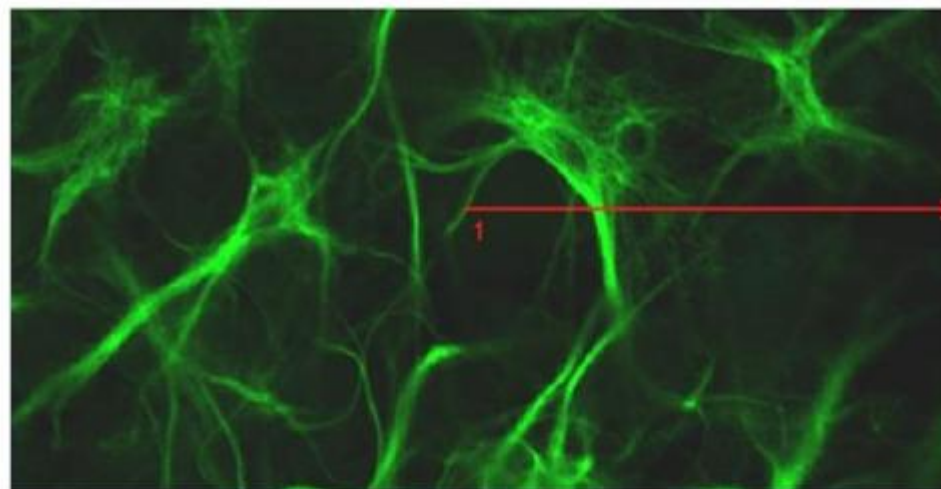
ZEISS 880操作规程

- 1、首次操作时务必在管理员的指导下进行。
- 2、共聚焦房间的空调设置温度为24℃、去湿，请勿擅自调节。
- 3、按1-11的顺序进行开机，其中7号不动，保持横的状态。
- 4、点击user启动电脑，点击灰色ZEN图标启动软件。弹出界面点击start system。
- 5、如果需要使用458、488、514，需要提前在Acquisition界面Laser中将Argon栏设置为on的状态，待指示显示从红色变为灰色，表示预热完成，方可操作。
- 6、放上样品，点击Locate，在Locate界面下选择快捷键，在镜下找出需要拍摄的样品区域。
- 7、若使用油镜，需在40倍或63倍的物镜上滴上蔡司专用镜油，然后将载玻片上盖玻片一面朝下放入载物台。
- 8、进入Acquisition界面点击smart setup，弹出框内点击Dye选择所用染料，拍摄方式选择中间的Best signal，设定好后点击Apply确认。
- 9、在Live下设置Channels中的激光强度Laser，针孔大小Pinhole（一般设置为1AU），检测器电压值Gain值（一般在800以内）。每个track单独设置，每次只勾选一个track。设置原则保证图像不要过曝，在live下选择range indicator可以显示出曝光程度。
- 10、在Acquisition Mode下将Frame size 设置为1024*1024，speed设置范围为6-9，Average设置为2或4。
- 11、选择需要成像的track，单击snap，获得一张多通道图像。拍摄成功后点击右上角小框内save image保存图片。
- 12、拷数据只能用全新格式化后的U盘进行拷贝，防止损害仪器。
- 13、用完后点击Laser中的Argon，将on改成off，关闭电脑。按启动时倒序依次关闭按钮，6号需放热5min后激光器风扇停止转动后放可关闭，7号保持不动。开关机必须在使用30min以上。
- 14、用无水酒精擦拭干净油镜，盖上防尘罩，写好仪器使用记录。
- 15、将房间卫生整顿好，垃圾带出实验室，负责人检查后方可离开。

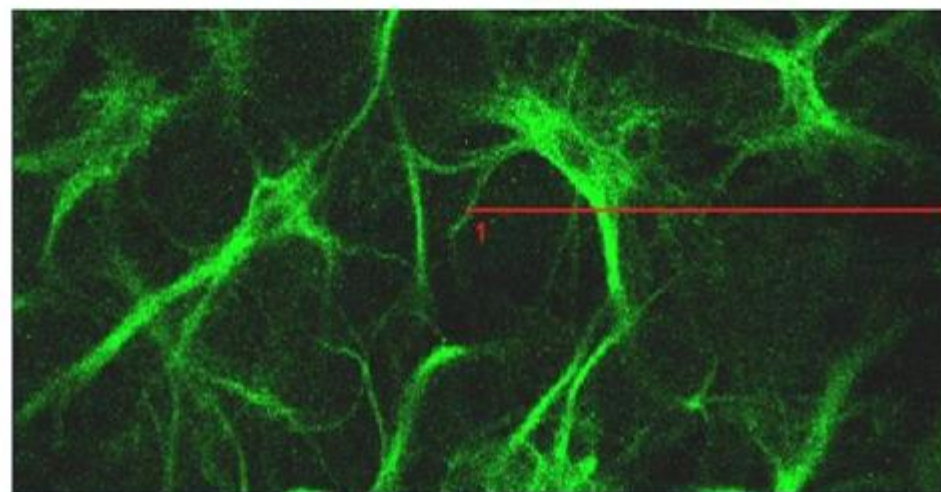


如何拍出一张好的图像？

“Good” Image



“Bad” Image



一张好的图片

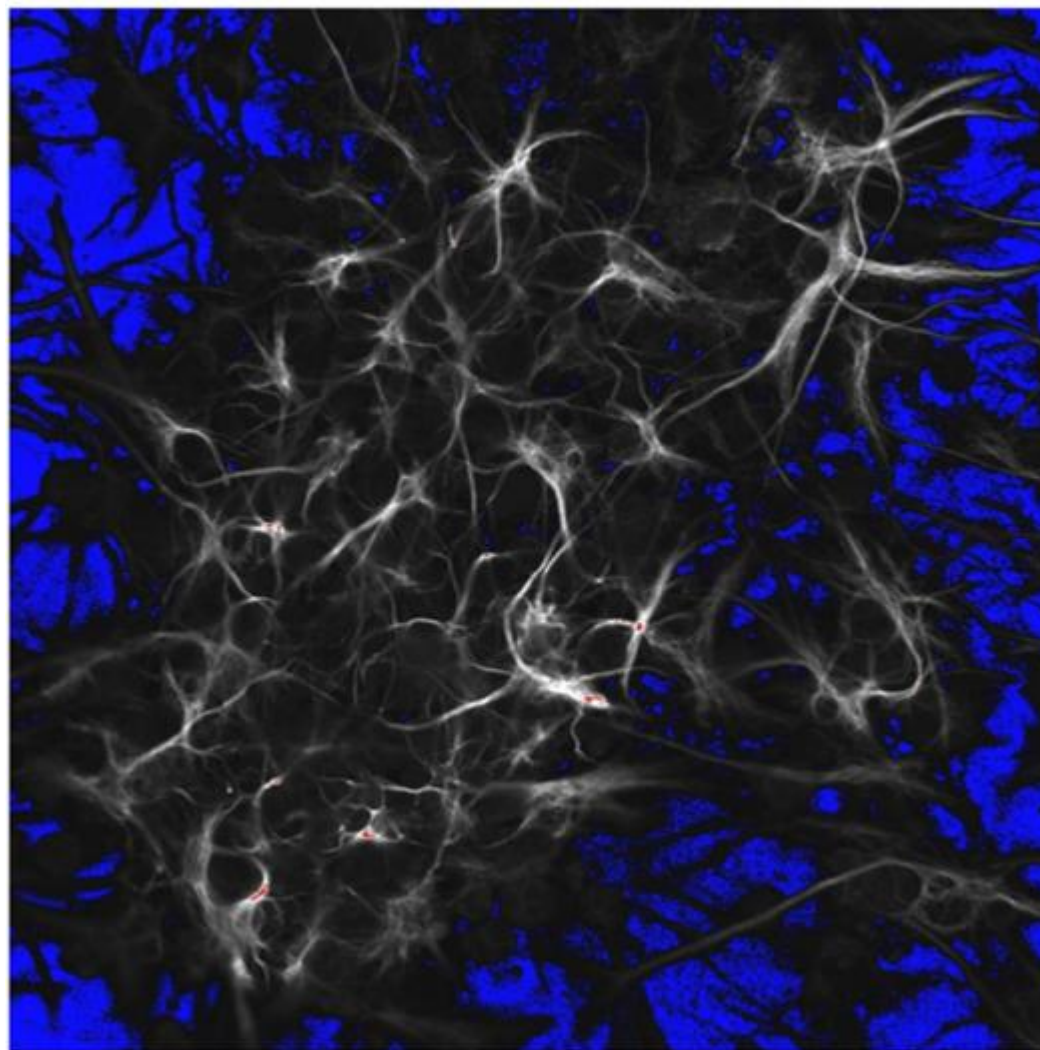
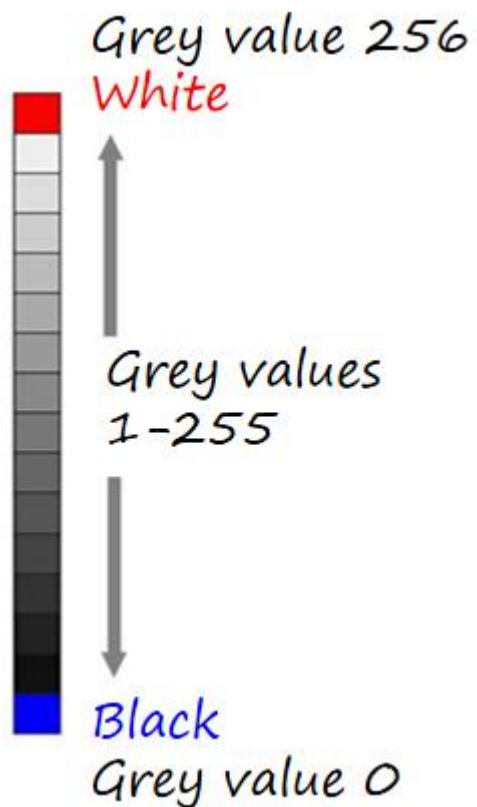
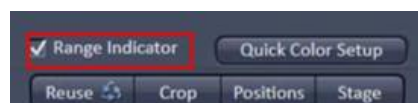
合适的亮度

Range Indicator

How to evaluate the dynamic range the best

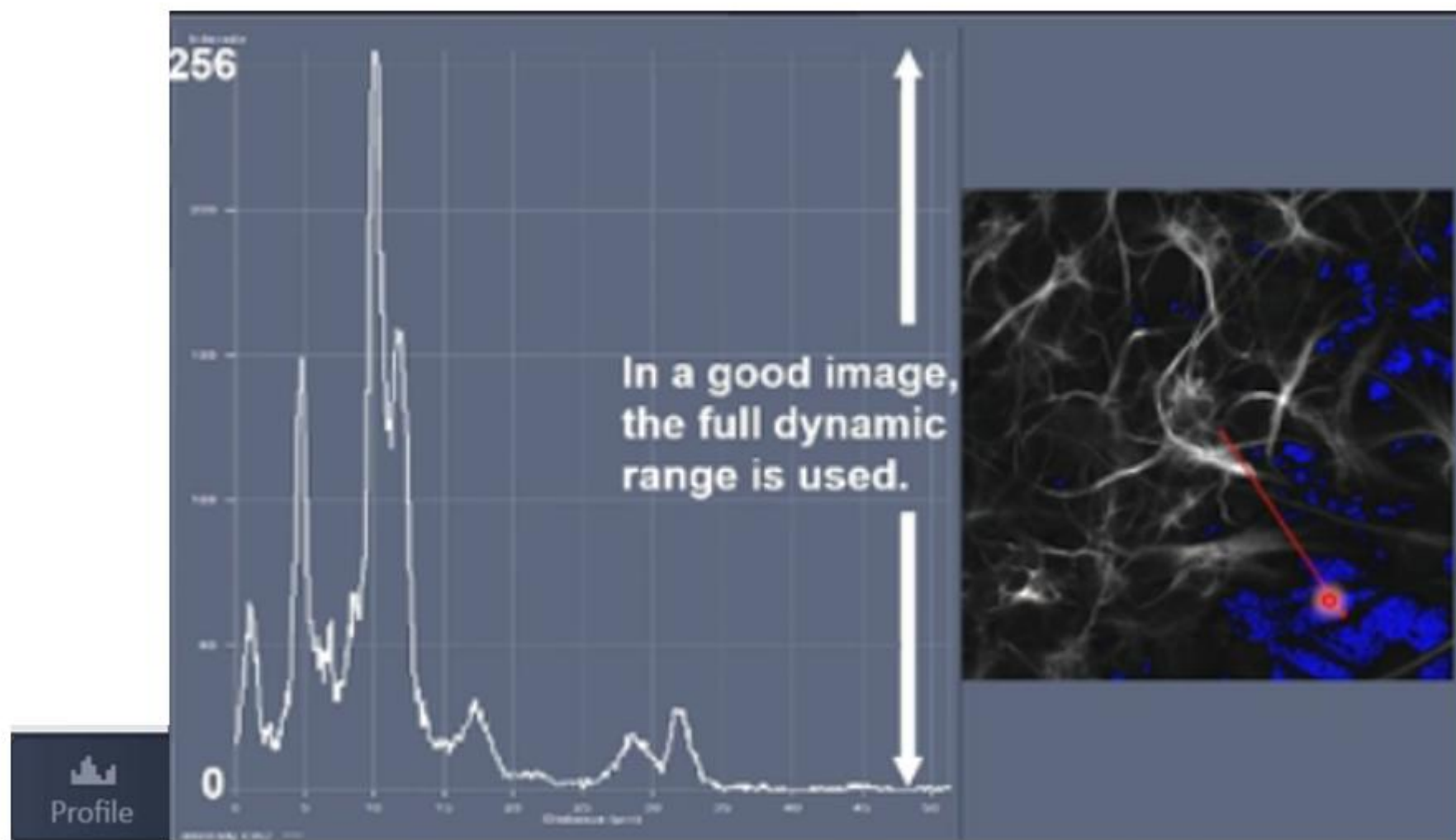
Look-up table

Range Indicator (8bit)



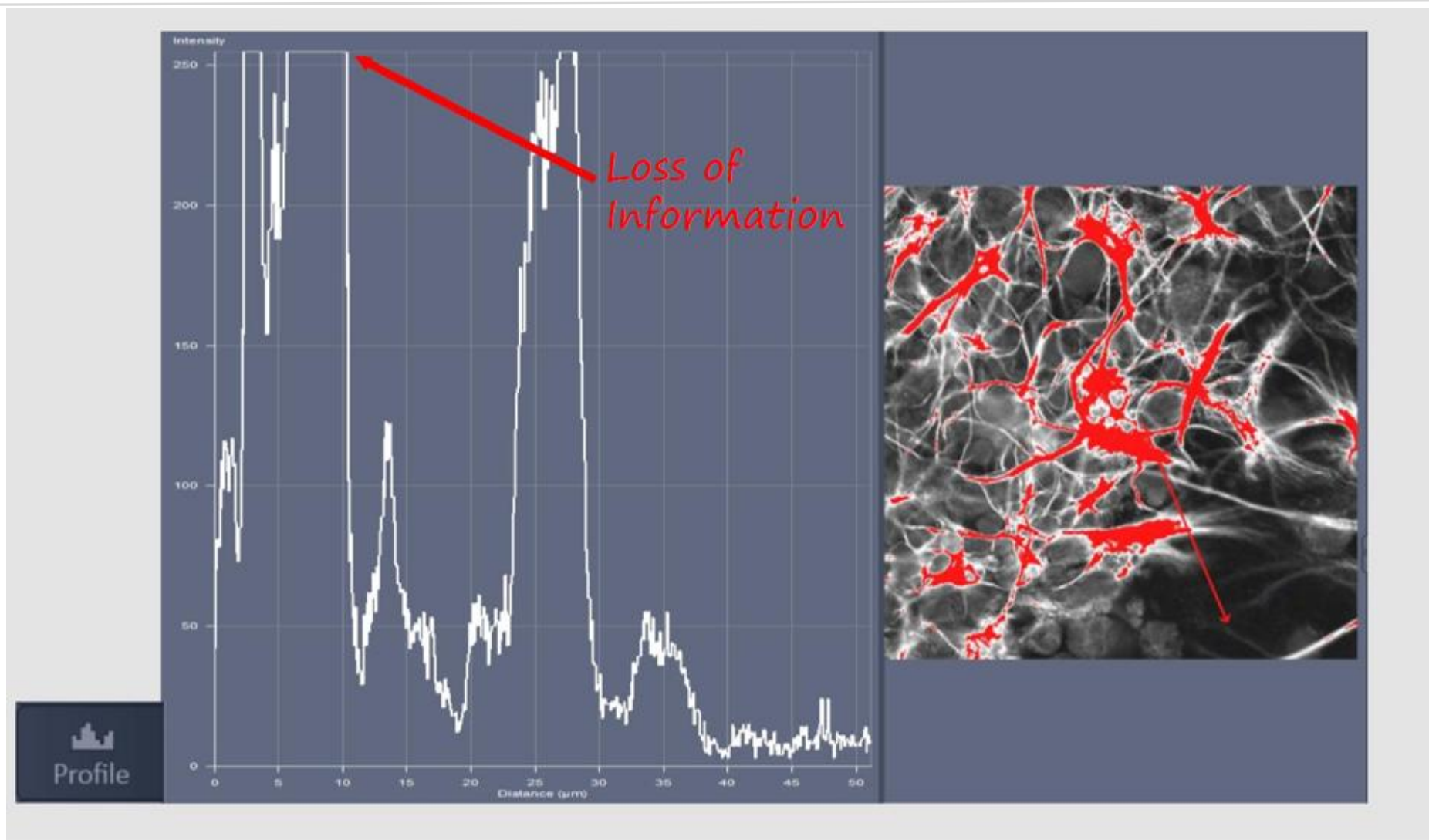
荧光强度

当调节合适的时候



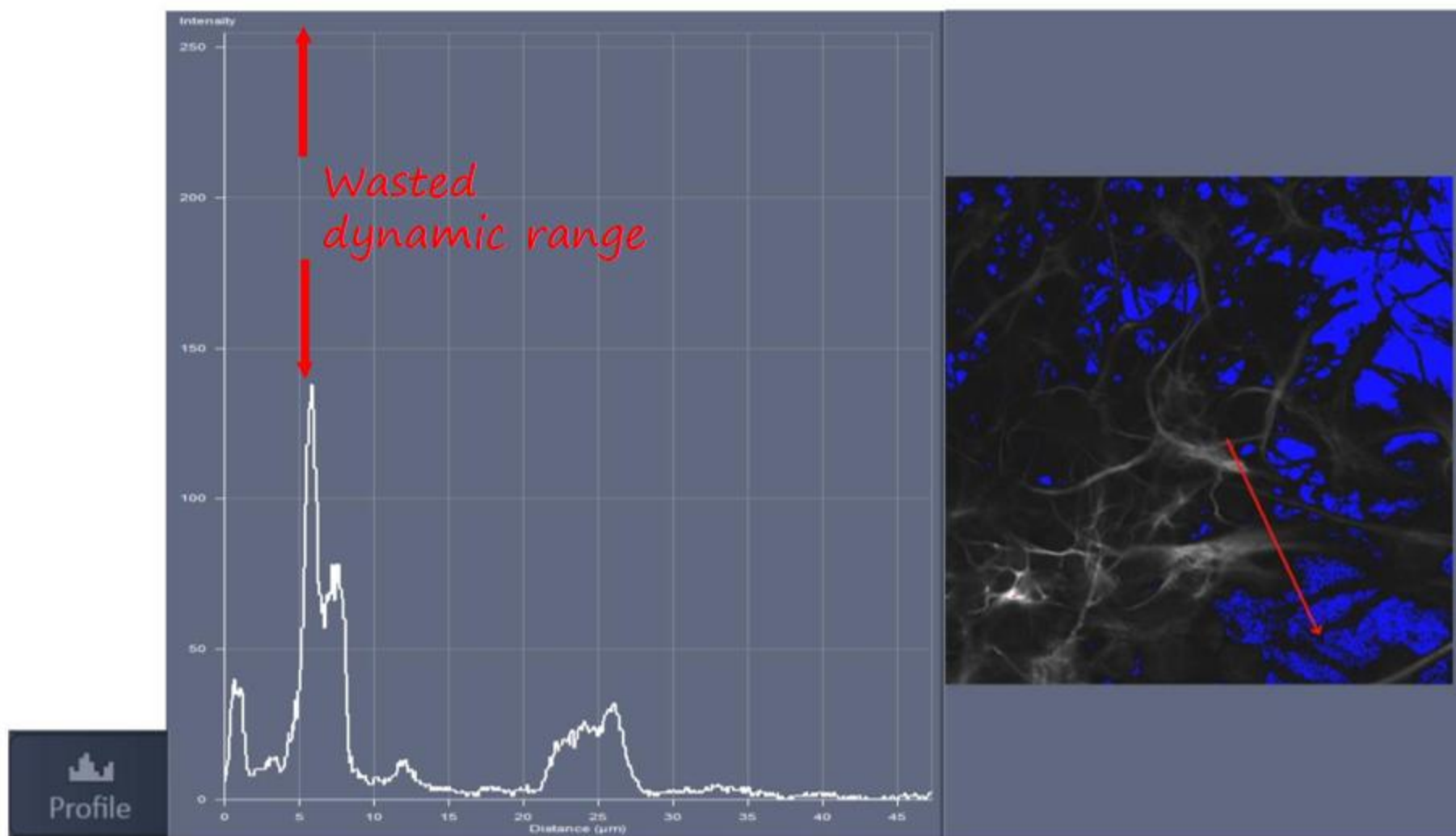
荧光强度

Set too high

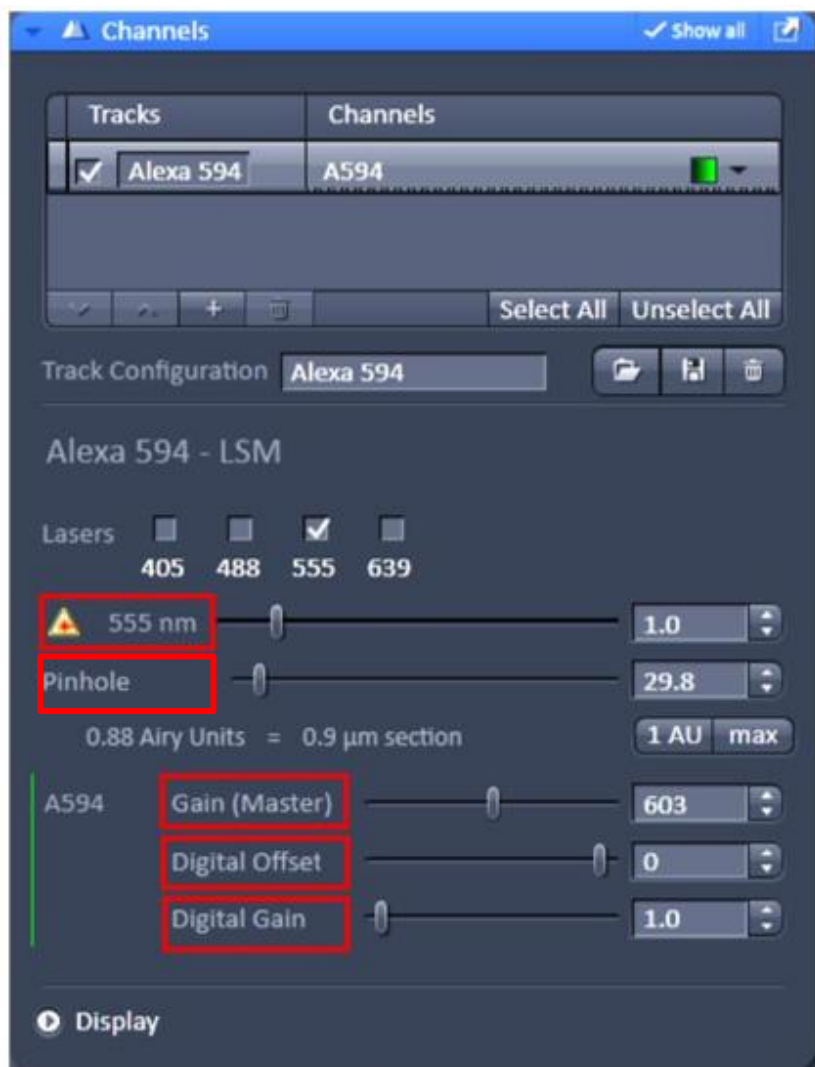


荧光强度

Not enough



合适的亮度



The main tools are:

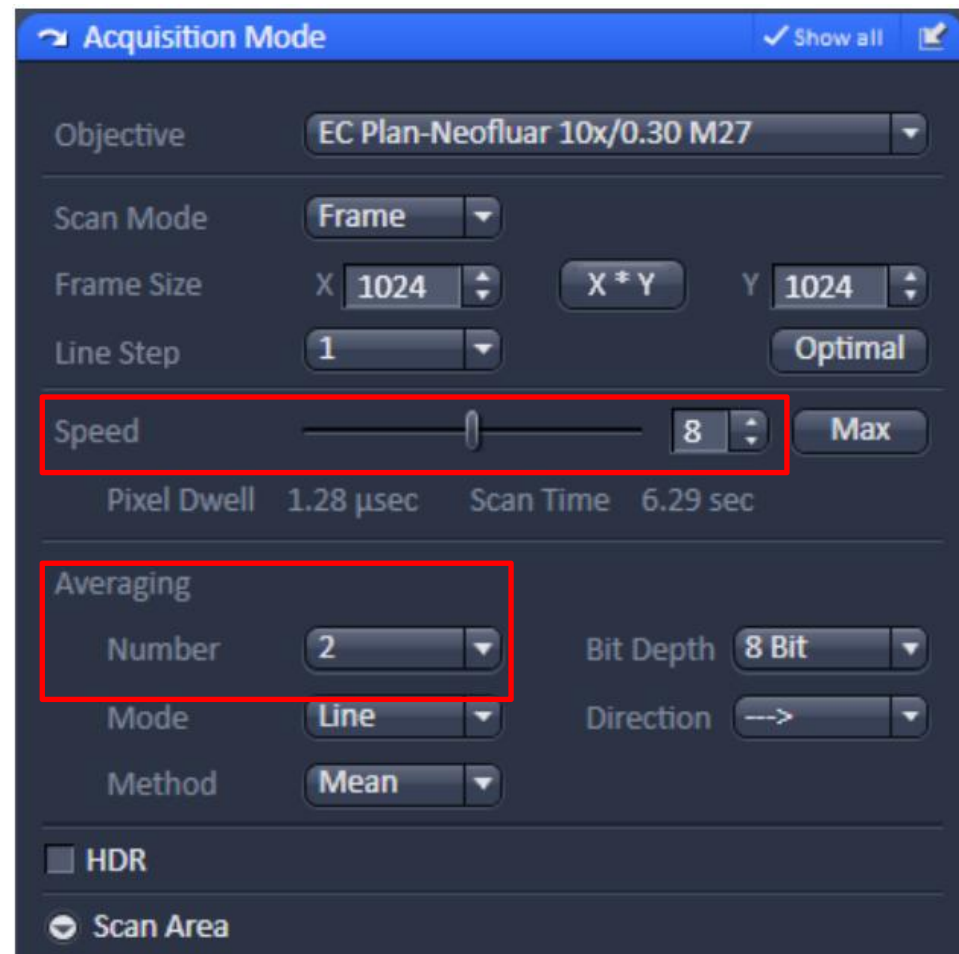
- **Laser power**（激光强度）：通过增加样本光子数来增加图像亮度，能量越高，图像越亮，但样本也易被漂白。
- **Pinhole**（针孔孔径）：针孔增加，光通量增加，图像变亮，非焦平面信号增加；针孔减小，光通量减小，图像变暗。一般情况，针孔大小为**1AU**。
- **Gain (Master)**（检测器电压值）：通过增加样本电子数来增加图像亮度，越高图像越亮，但背景噪点也会提高。
- **Digital Offset**：给一定的负值，会将图像背景扣掉一部分，使背景更干净。

一张好的图片

信噪比

影响信噪比的因素主要有两个，分别是扫描速度（Speed）和平均次数（Average）

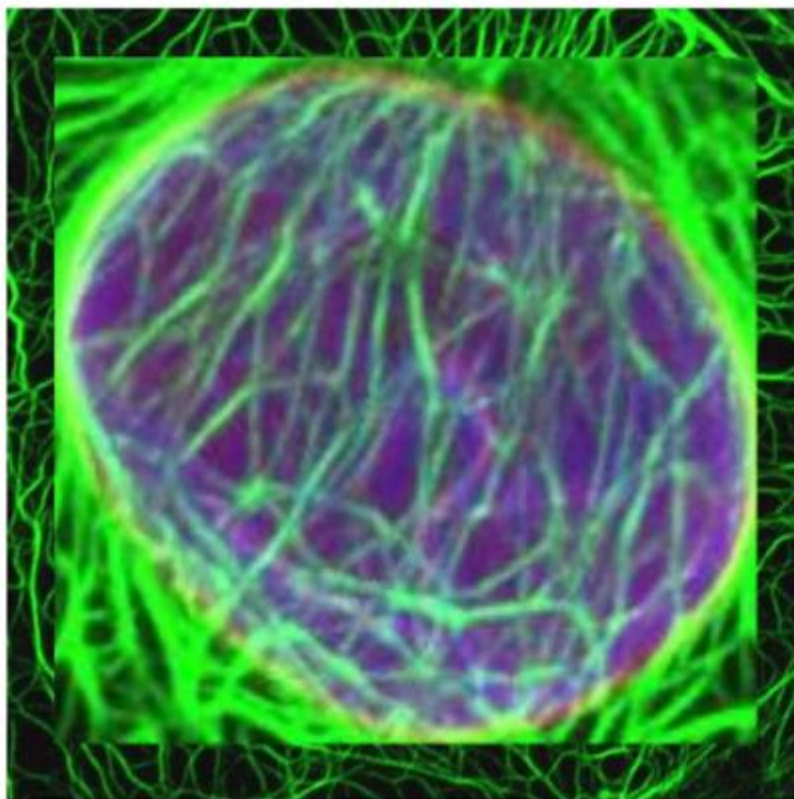
影响信噪比因素	增大	减小
扫描速度 (Speed)	信噪比下降， 但扫描时间缩短	信噪比提高，但 扫描时间增长
平均次数 (Average)	次数越多，信 噪比相对越好， 但扫描时间增长	次数减小，信噪 比降低，但扫描 时间缩短



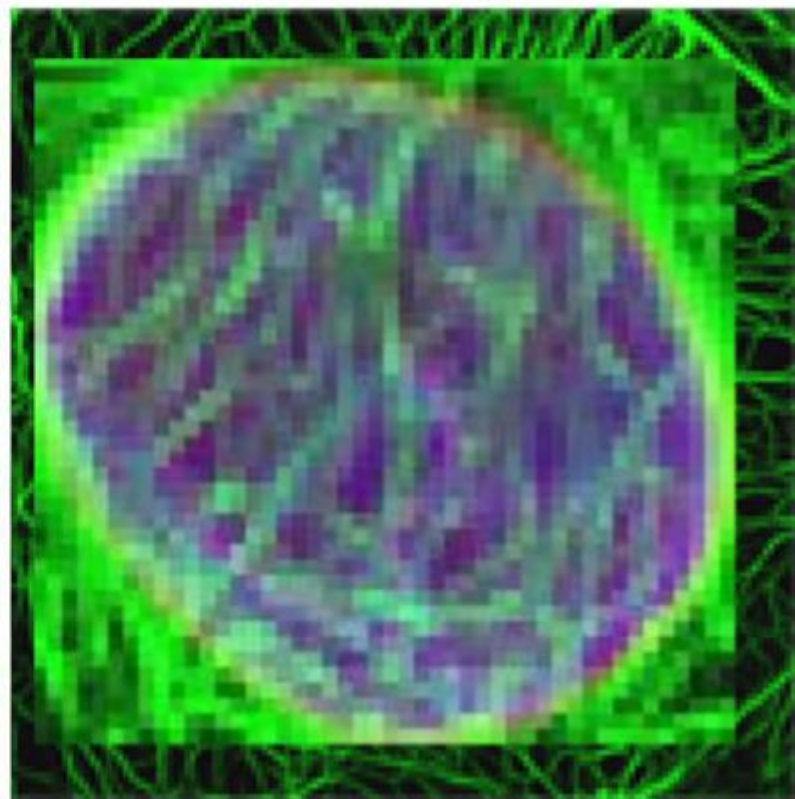
一张好的图片

分辨率

选择合适的分辨率



Resolution okay

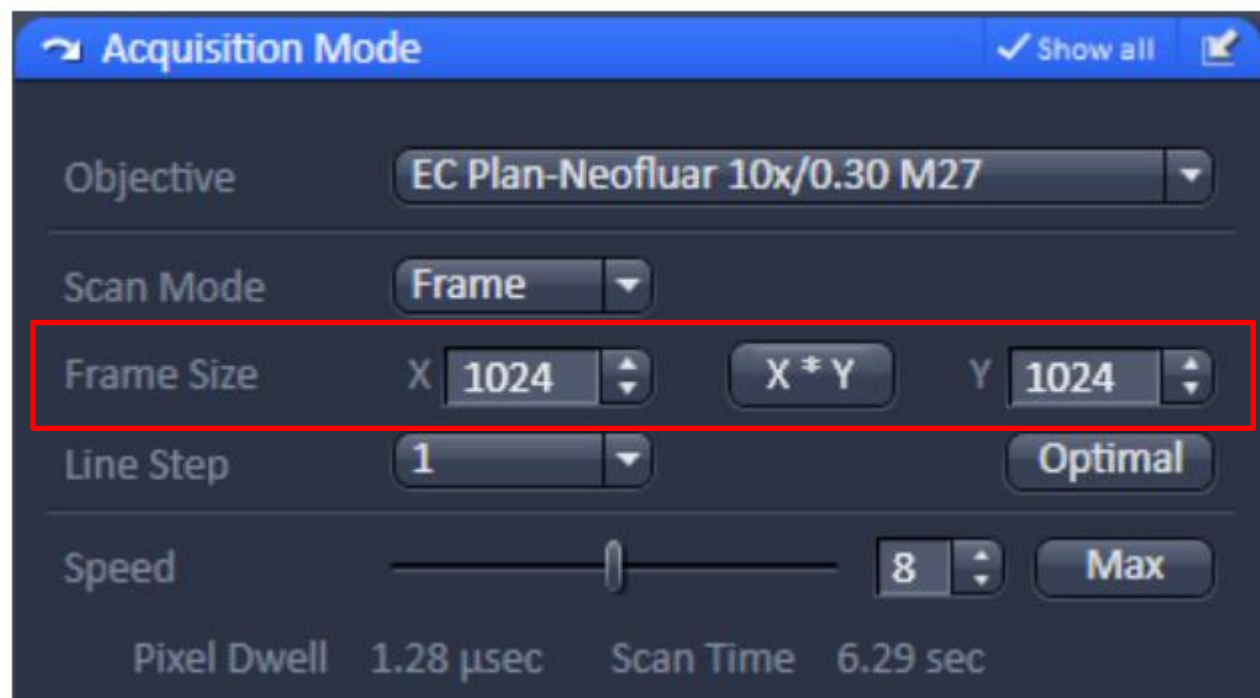


Resolution too low

选择合适的分辨率

分辨率是能区分开两个点之间的最小距离，所以分辨率越小越好，而分辨能力越大越好。

- 影响分辨率的一个重要因素是物镜的数值孔径（NA）值。NA值越大，分辨率越小。
- 除此之外是图像的数码分辨率，也就是Frame Size。一般情况下，我们选择 1024×1024 。



激光共聚焦基本功能

基本功能:

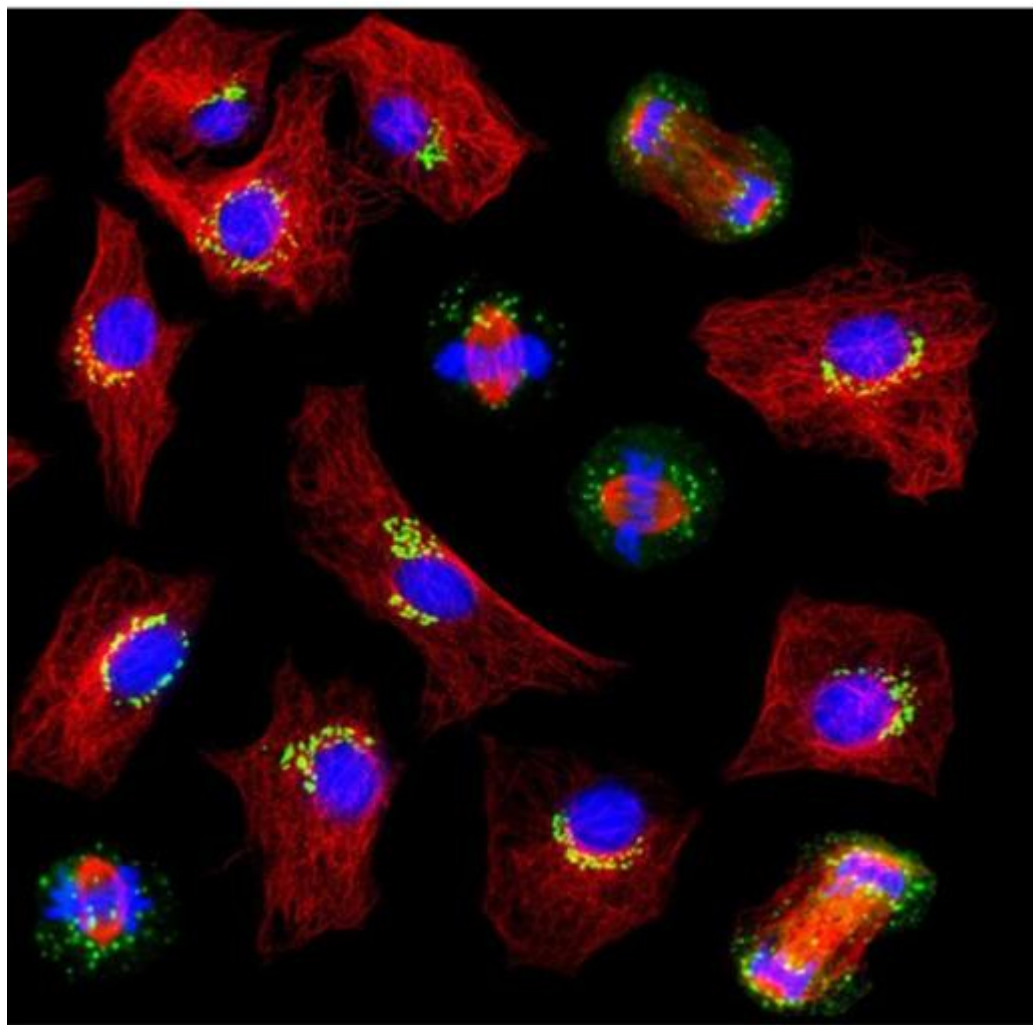
- ✓ 单色/多色荧光成像
- ✓ z轴采集, 三维重构
- ✓ 时间序列成像
- ✓ 大视野拼图
- ✓ 光谱成像/光谱拆分

测量分析:

- ✓ 荧光强度分析
- ✓ **profile**功能, 分析一条线上荧光强度的分析
- ✓ 共定位分析

基本功能：二维荧光图像采集

拍摄高质量的单通道或多通道荧光照片



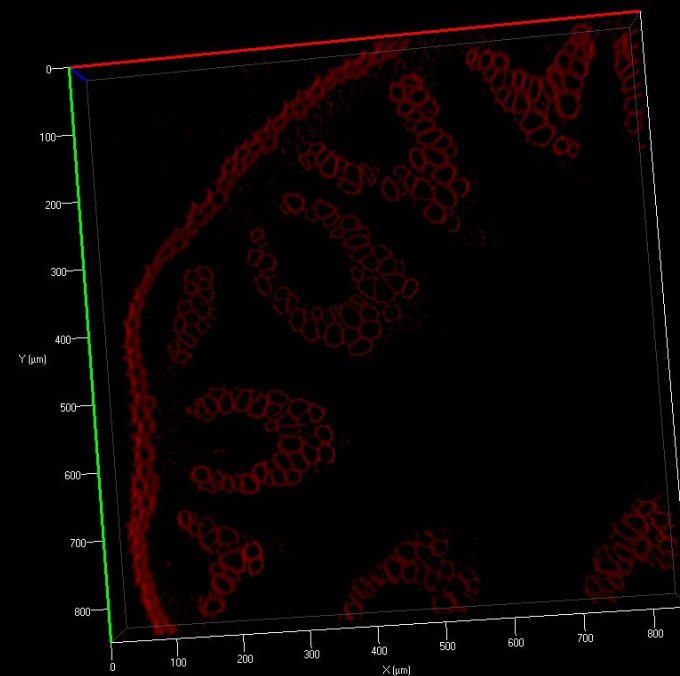
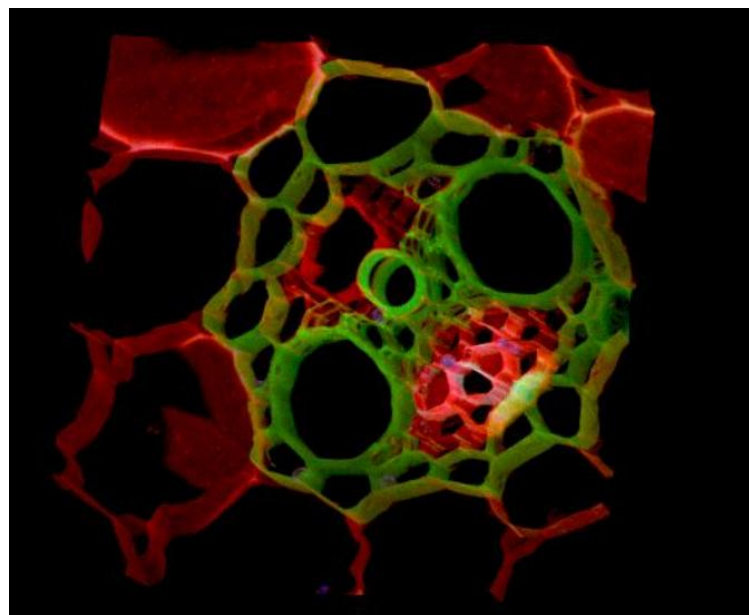
大鼠肾细胞

Green: GFP融合蛋白, 高尔基体 - 荧光蛋白

Red: 抗体, 微管 - 免疫荧光

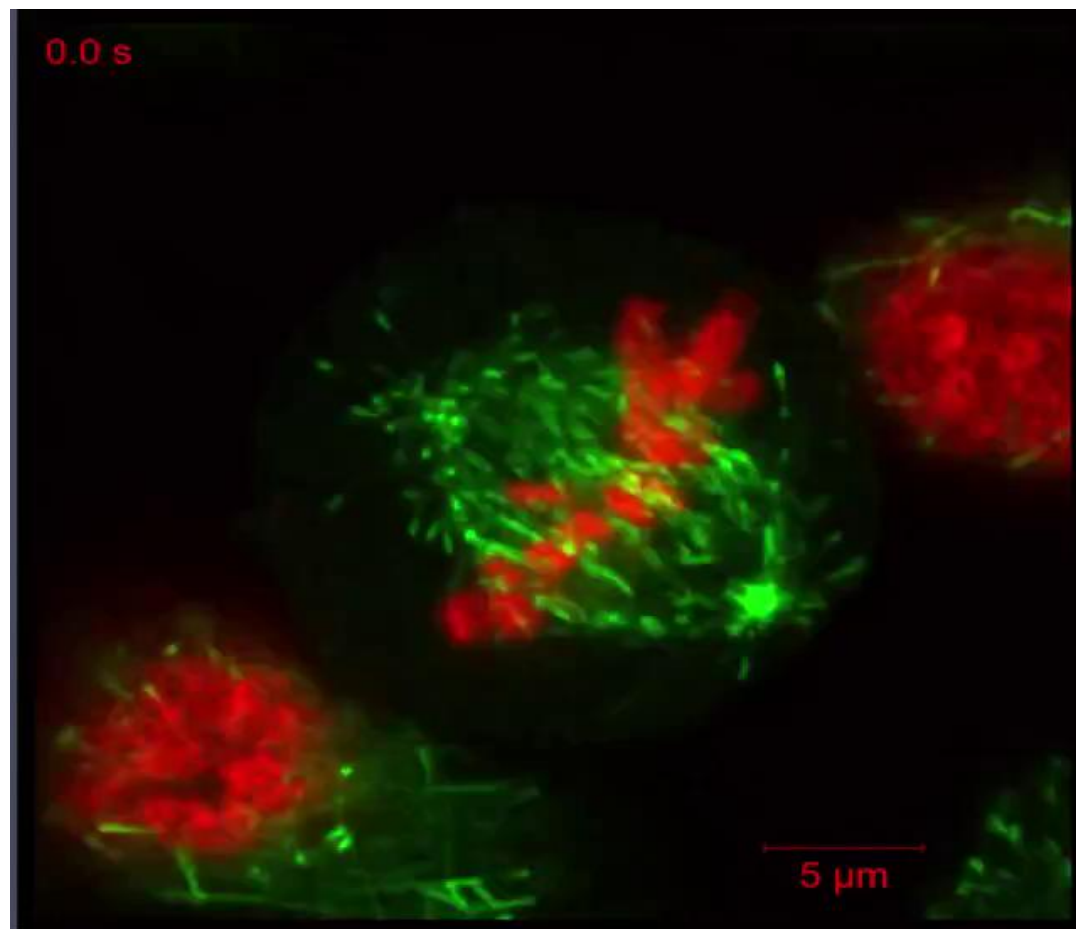
Blue: DAPI, 细胞核 - 荧光染料

基本功能：Z轴采集（z stack） 三维重构



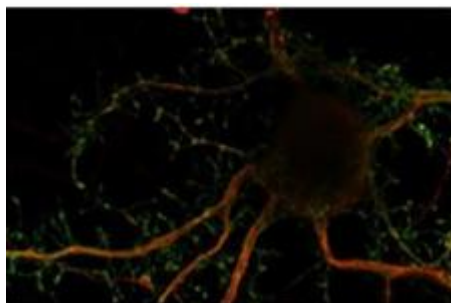
Z轴采集
最大强度投影

基本功能：时间序列成像 (time series)



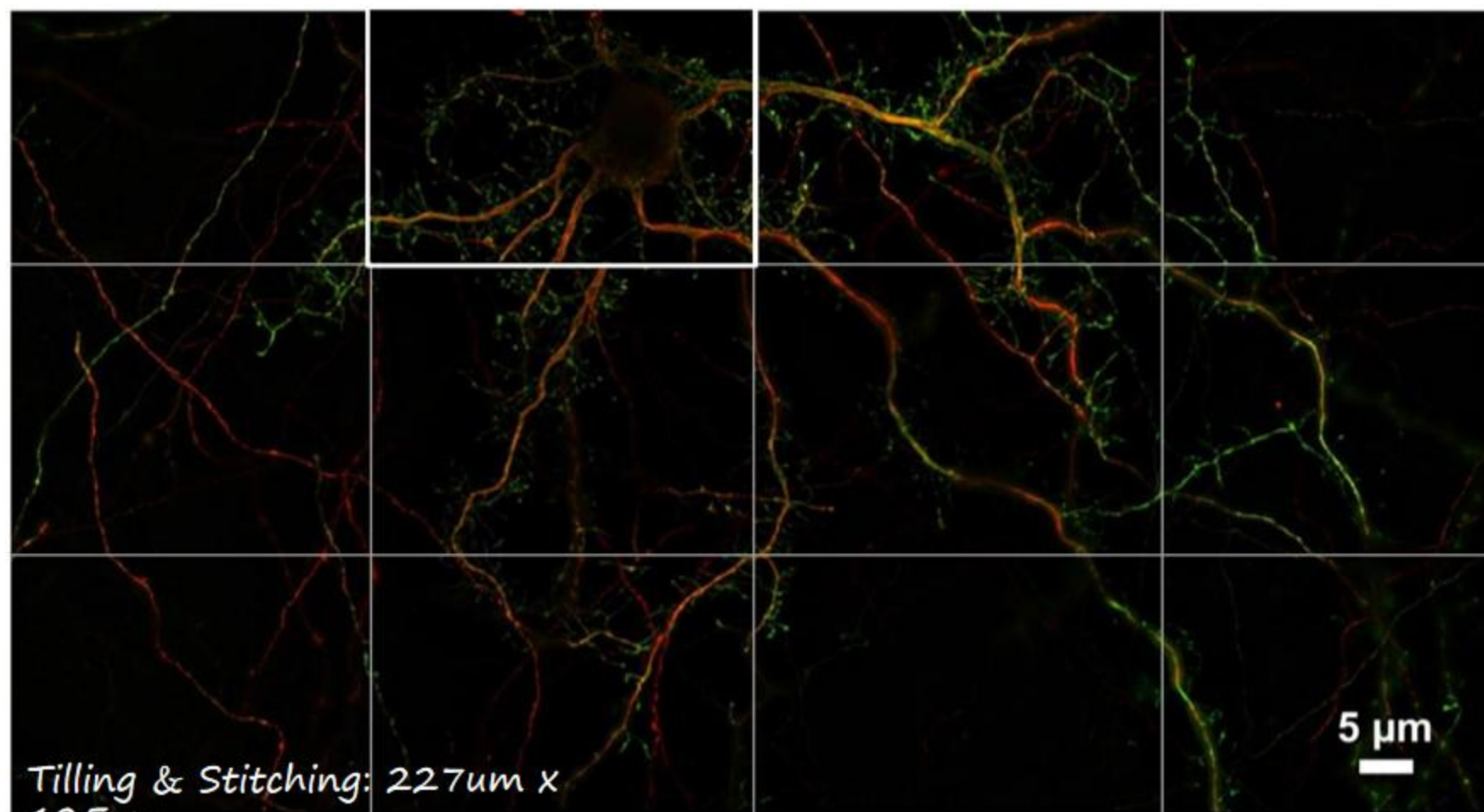
基本功能：大视野拼图 (tile)

视野的扩展



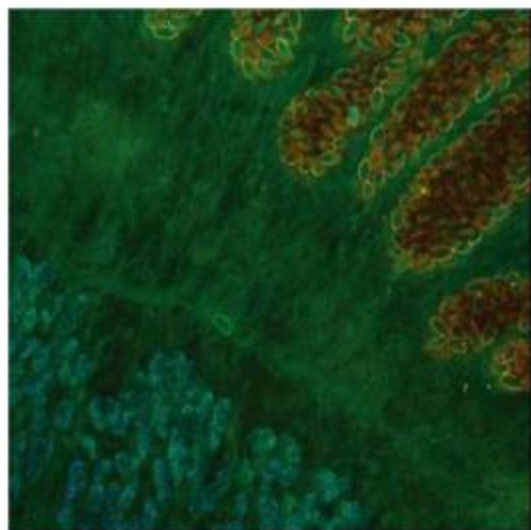
基本功能：大视野拼图 (tile)

视野的扩展

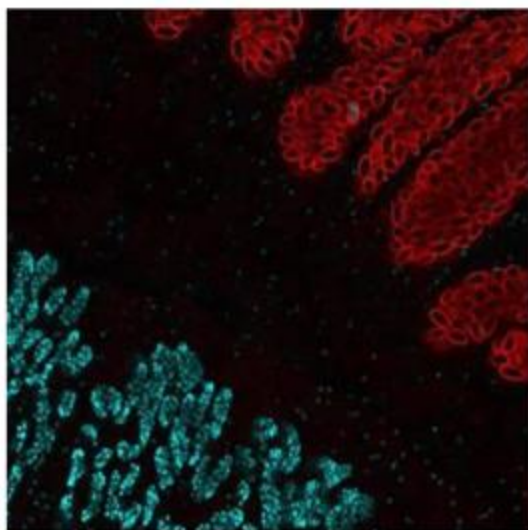


扩展功能：光谱扫描，线性拆分 最大程度避免荧光串色的影响

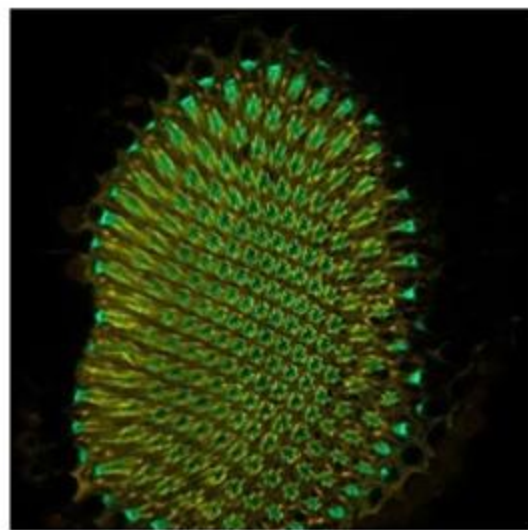
original



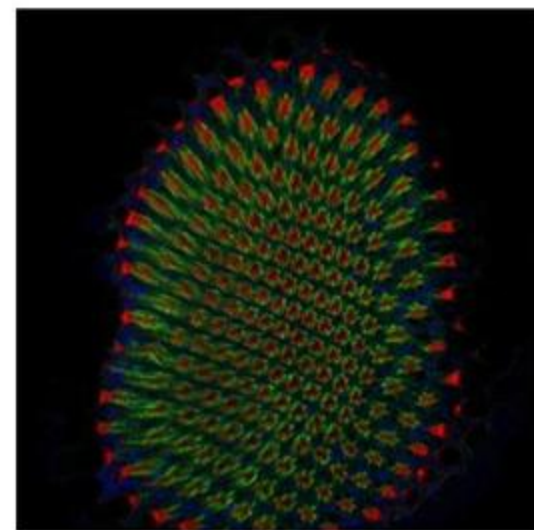
unmixing



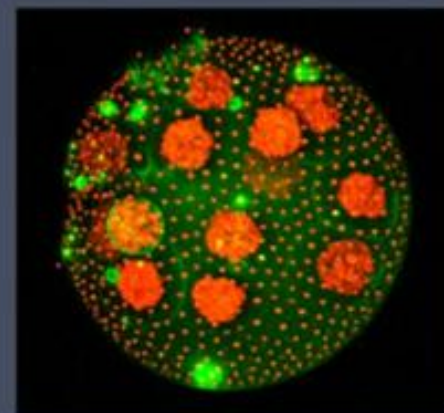
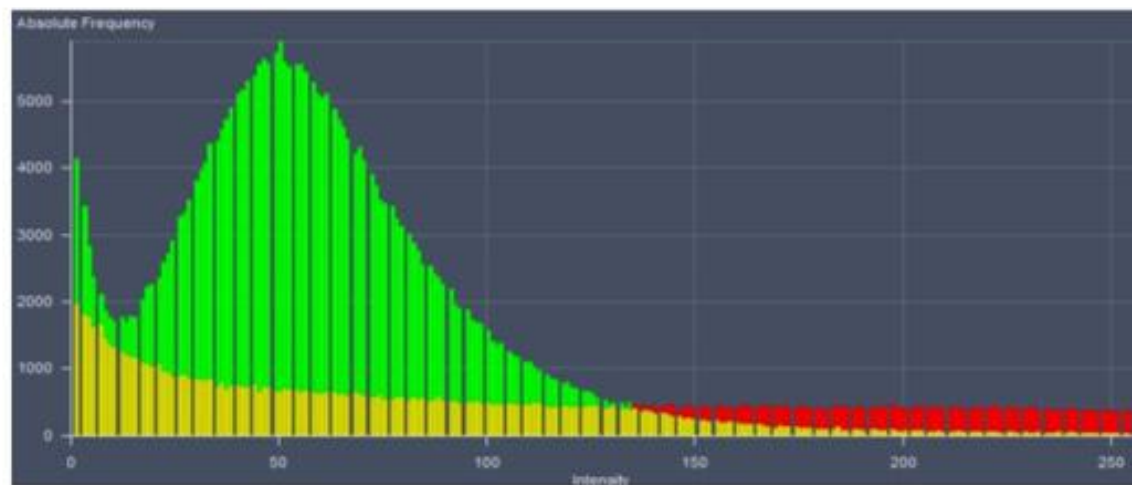
original



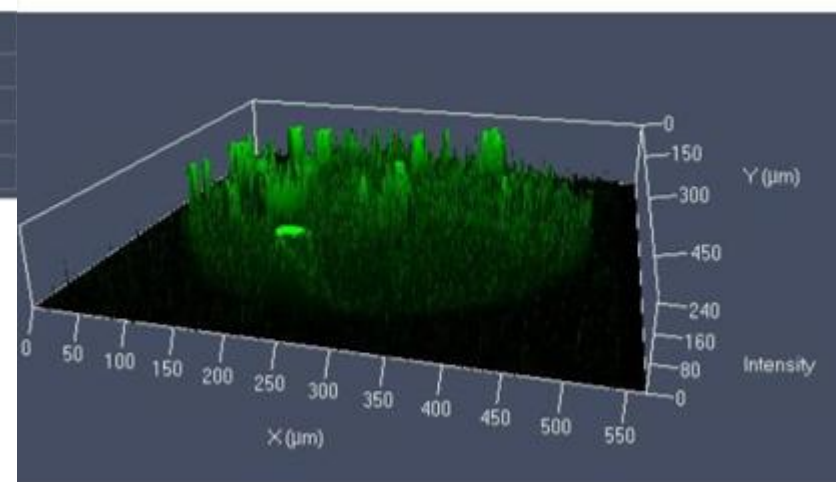
unmixing



基本功能：荧光强度的分析

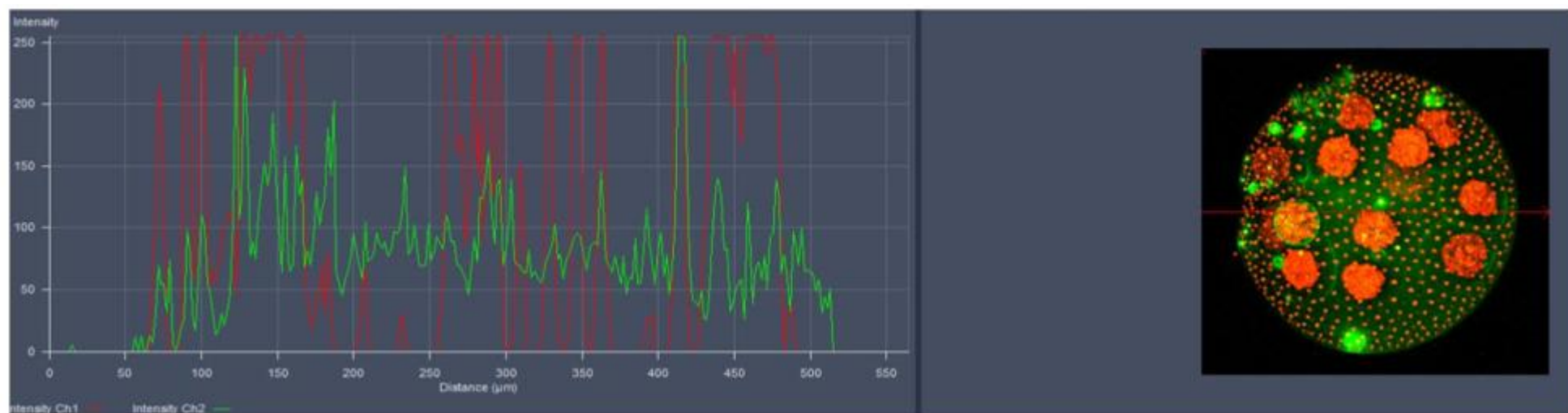


	Ch1	Ch2
Mean Intensity	43.45529	37.38946
Standard Deviation	84.16126	44.23883
Pixels	522900	522900
Area [$\mu\text{m} \times \mu\text{m}$]	299038.87	299038.87



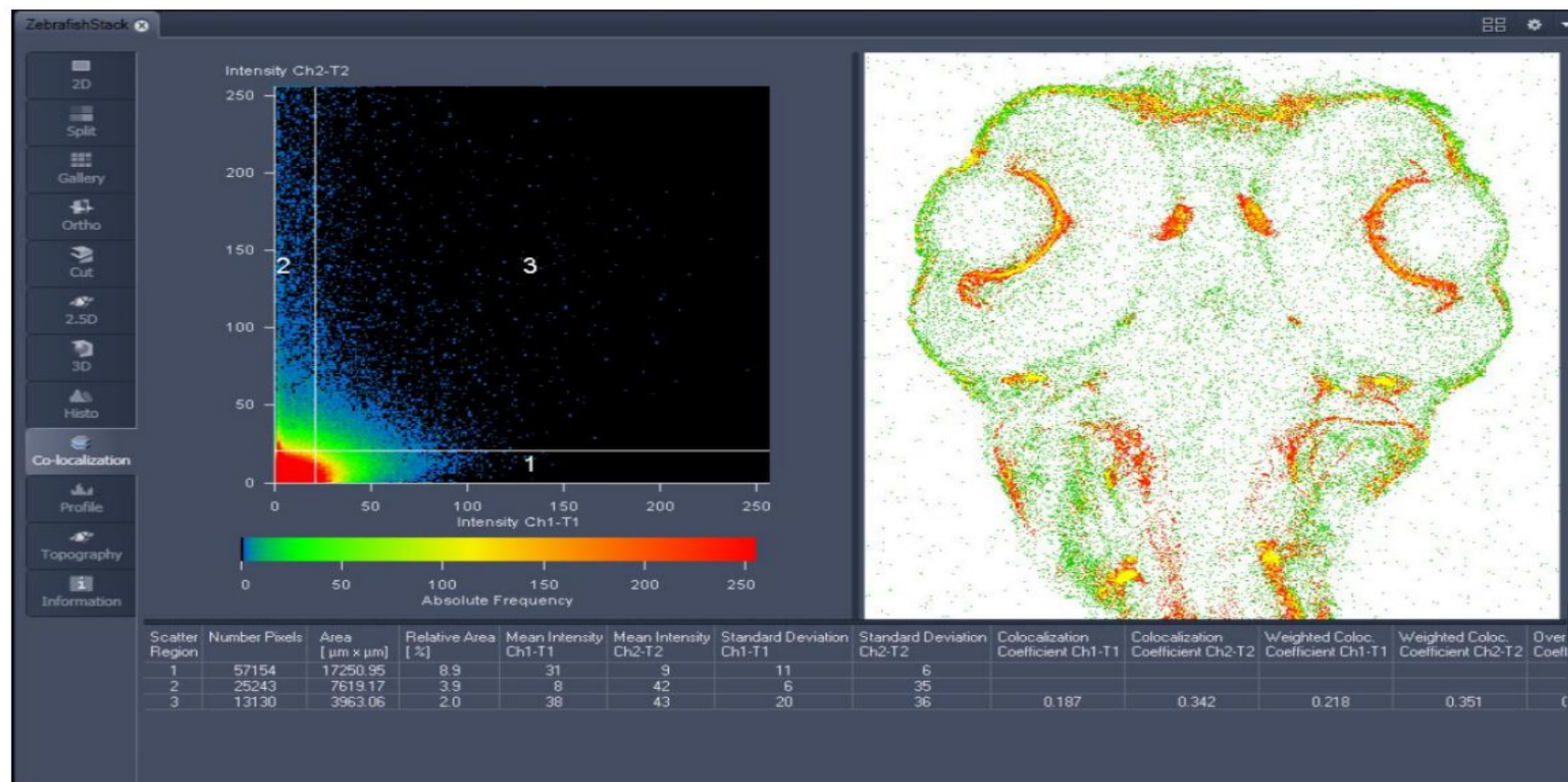
基本功能：Profile 功能

分析一条线上的荧光强度的分布



基本功能：共定位分析（Co-localization）

两种荧光信号的共定位定量分析



直接显示所选区域荧光信号的共定位系数

共聚焦的使用要求

- 1，实验室温度应保持在 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度 40%-60%
(注：如果需要做时间序列的实验，在实验期间温度的变化不能超过0.5度/小时)
- 2，防静电，防灰尘，人员进入共聚焦室穿戴鞋套或更换拖鞋
- 3，空调的进/出风口或抽气扇应远离显微镜系统，以避免干扰系统运行的稳定性
- 4，刻录图像数据资料：应使用刻录光驱刻录，实验前应准备好刻录光盘
- 5，注意环境和仪器清洁，避免有毒有害试剂污染

01

病理技术简介

• Part one •

● ○ ○ ○



病理技术简介

病理学概念

一门研究疾病发生发展规律的医学基础学科，揭示疾病的病因、发病机制及病理的改变。

病理技术的应用

基础与临床之间的桥梁，广泛应用于检测多种疾病的发生及进程。

病理技术的变迁

从器官，细胞，超微，免疫，分子直到信息病理学



病理平台仪器



全自动全封闭脱水机



HistoStar 包埋工作站



HM325全自动转轮式切片机



NX50冷冻切片机



HM525冷冻切片机



TissueFAXS Plus 全景组织细胞定量分析系统

02

病理实验流程

• Part two •

○ ● ○ ○



实验流程





固定

离体标本 $\xrightarrow{\text{微环境破坏}}$ 自溶



固定的意义

- 使蛋白质凝固，终止或减少分解酶的作用，防止自溶。
- 保存组织、细胞内的蛋白质、脂肪、糖原、某些维生素及病理性蓄积物，维持病变的特异性特征。
- 组织硬化成形，便于后续的包埋、切片以及染色。



如何固定？



固定方法

物理法：低温冷冻、真空脱水。

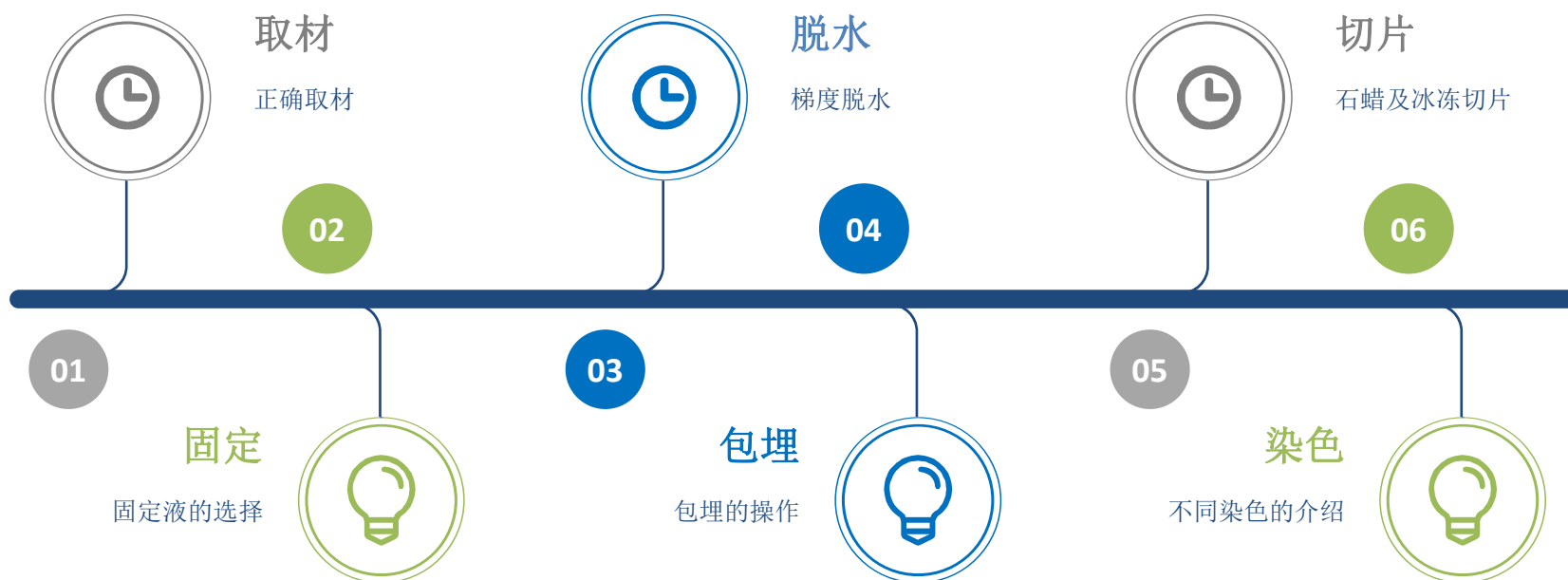
化学法：化学固定液处理。

固定液的选择

- 甲醛：最常用的固定剂，对脂肪、糖类、神经及髓鞘等固定效果好，固定时间长的组织易产生黑色沉淀。
- 乙醇：常用80%-90%的乙醇，固定的同时也可脱水，用于糖原、纤维蛋白及弹性纤维的固定，但是会导致核的着色不良及破坏色素。
- 醋酸：能沉淀核蛋白,可较好地保持染色体结构，但是会导致组织明显膨胀。
- 中性甲醛液：配制过程较复杂，适合绝大多数组织的固定，效果比单纯甲醛好。
- AAF液：醋酸可以补偿甲醛及乙醇导致的组织收缩和硬化，但是对膜浆蛋白结构有破坏作用。



实验流程





脱水、包埋

概念

- 脱水：将组织中的水分用酒精置换出来，使组织逐渐变硬，为石蜡浸润组织创造条件。
- 透明：由于乙醇与石蜡不相溶，而二甲苯既能溶于乙醇又能溶于石蜡，所以要经过二甲苯来置换酒精，以便于融化的石蜡浸润到组织间隙中。
- 浸蜡：使石蜡渗入组织中，固定组织，准备包埋切片。
- 包埋：浸蜡后的组织与熔化的石蜡在模具中冷却固定为一定形状的过程称为包埋。



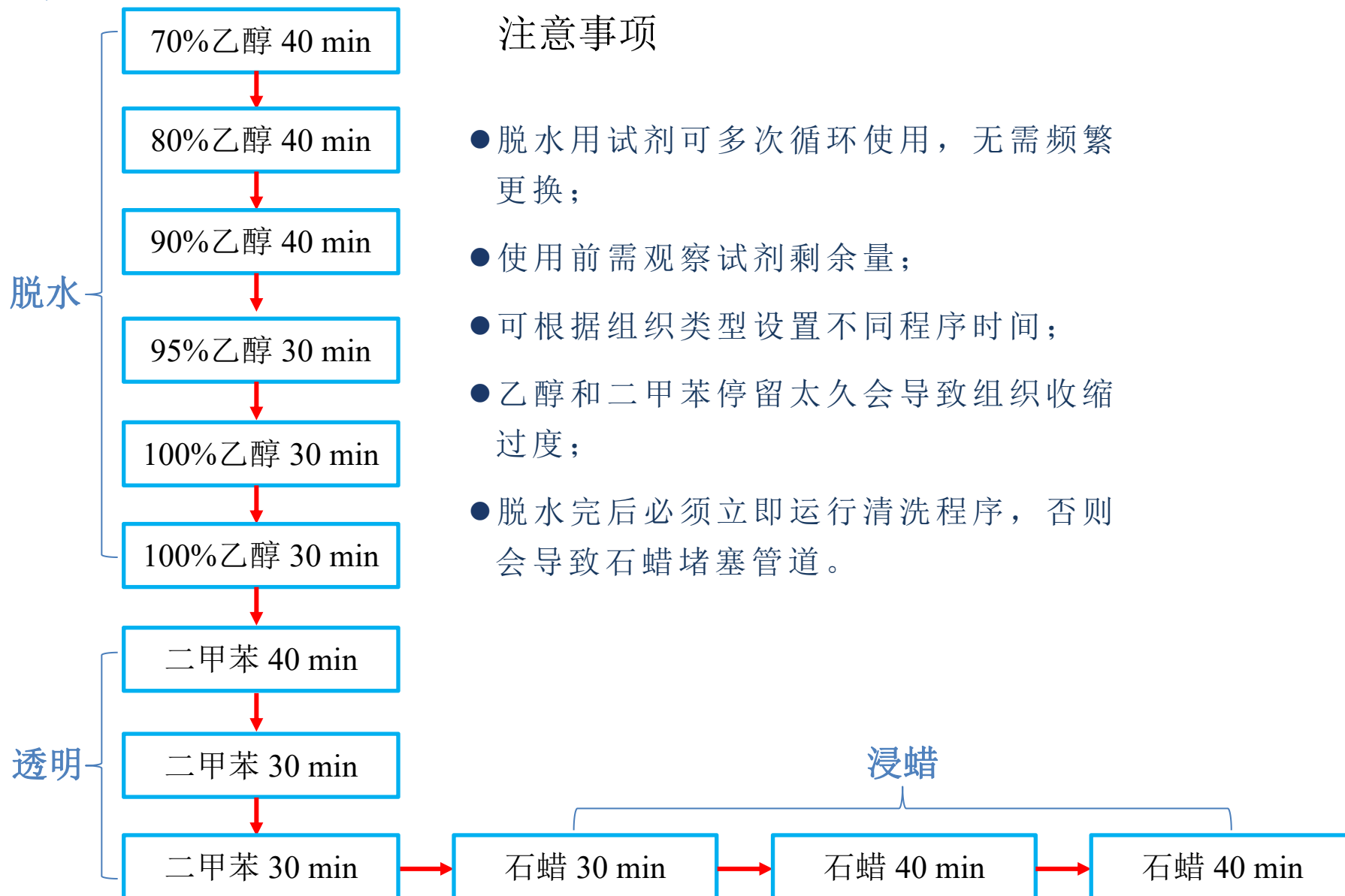
Excelsior ES® 全自动全封闭脱水机

- 一次性可处理300个组织盒；
- 操作程序方便快捷；
- 通过多层式设计，合理利用试剂耗材。

第五实验楼210房间



脱水流程



注意事项

- 脱水用试剂可多次循环使用，无需频繁更换；
- 使用前需观察试剂剩余量；
- 可根据组织类型设置不同程序时间；
- 乙醇和二甲苯停留太久会导致组织收缩过度；
- 脱水完后必须立即运行清洗程序，否则会导致石蜡堵塞管道。



包埋流程



第五实验楼210房间

HistoStar 包埋工作站

- 一次性可放置72个蜡块的超大冷台；
- 可设置多模块温度，搭配不同熔点石蜡使用；
- 操作流程方便快捷，从浸蜡到冷却一体化操作；

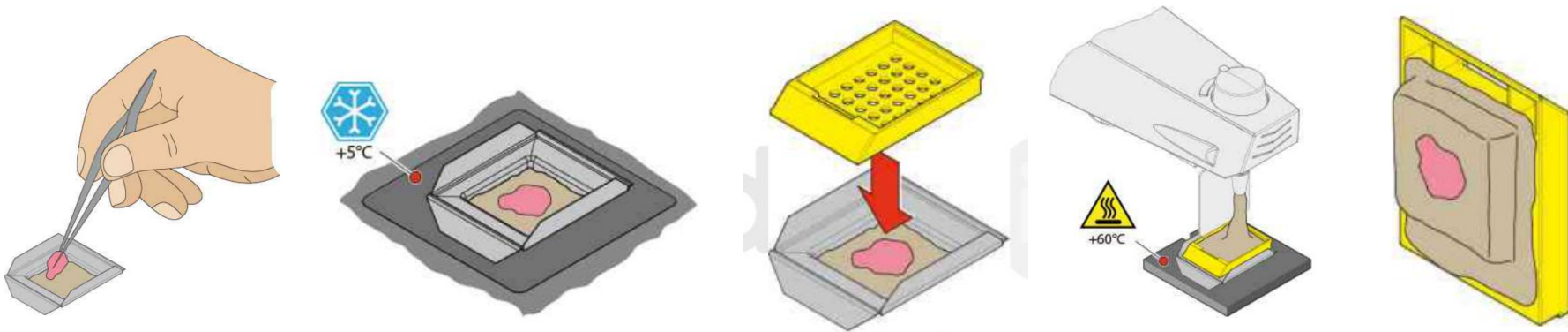
注意事项

- 组织槽和熔蜡缸使用的石蜡不同，熔蜡缸内推荐使用高熔点石蜡；
- 使用前需观察试剂剩余量；
- 废蜡抽屉需要及时清理，否则会导致石蜡黏住桌面；
- 冷台模块用完需关闭，否则会大范围结霜，引起机器损伤。



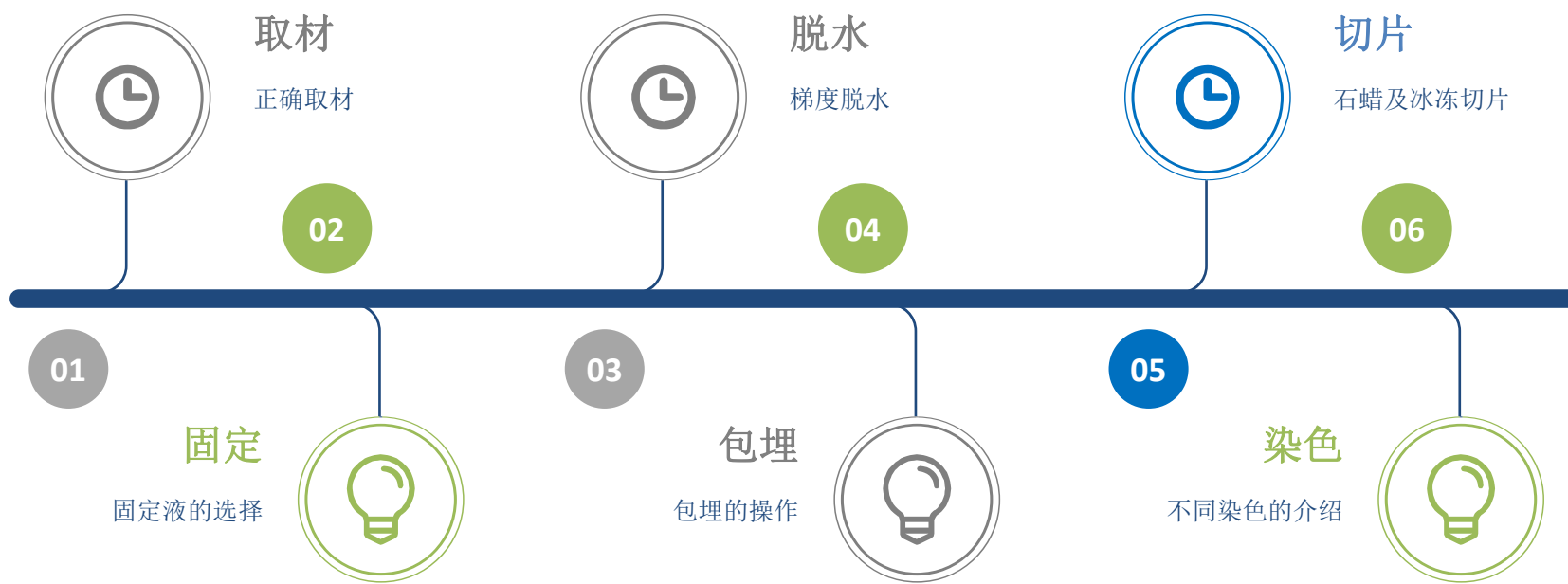
包埋流程

- 使用镊子取出组织盒内样本，将其固定在包埋模内；
- 将包埋模移到冷却台上，等石蜡变透明为止；
- 将包埋模移回热台，然后将组织盒放置其上；
- 用石蜡将组织盒填满，而后置于冷台冷却凝固；
- 完全冷却后，可取出组织盒准备切片。





实验流程





切片



概念

要实现对病变组织的显微镜形态学检查，需要将获得的病变组织制片。



HM325全自动转轮式切片机



NX50冷冻切片机



HM525冷冻切片机

第五实验楼210房间



切片机的构造





石蜡切片流程

- 将组织样品固定在样本夹头上，将样本头与刀片距离调近；
- 使用粗修模式，将切片厚度设置为15-30 μm 进行修片，修到所需切面为止；
- 将切片厚度调节至3-5 μm ，摇动手轮进行精细切片；
- 将切片平稳放入水中展片，展平后转移到玻片上；
- 放入烤片机或烘箱内烤片，用于后续实验



注意事项

- 注意切片厚度，一般选择3-5 μm ；
- 任何时候手要离开转轮，都必须将转轮上锁，防止手割伤；
- 刀架角度和位置均为预设好的，请勿随意改变刀架；
- 玻片需使用黏附载玻片，防止后续染色步骤容易脱落；
- 烤片推荐使用烘箱，70 $^{\circ}\text{C}$ 烤2h左右效果最佳。

第五实验楼210房间



冰冻切片流程

- 将组织样品用包埋剂固定，放在速冻装置上进行冷冻；
- 将样品已经冻好的冷冻头固定在仪器内的底座上，调整组织样品切面方向与刀座平行
- 调整好刀座及角度，安装好一次性刀片，选择TRIM模式修片；
- 粗修完选择SECTION模式，选择合适的切片厚度，放下防卷板，摇动手轮进行精细切片，用玻片收集所需的切片；
- 切片完成后，及时卸下刀片，将废弃的刀片放入专门的回收盒内，将切片机箱内清理干净，做好使用登记。

注意事项

- 切片后取切片前要锁住手轮，防止手受伤；
- 仪器使用完后，需要取下刀片；
- 玻片使用前无需预冷，常温玻片可使切片迅速黏附上去；
- 在调整冷冻头角度的时候一定要盖上刀片保护器，小心被刀片划伤。

03

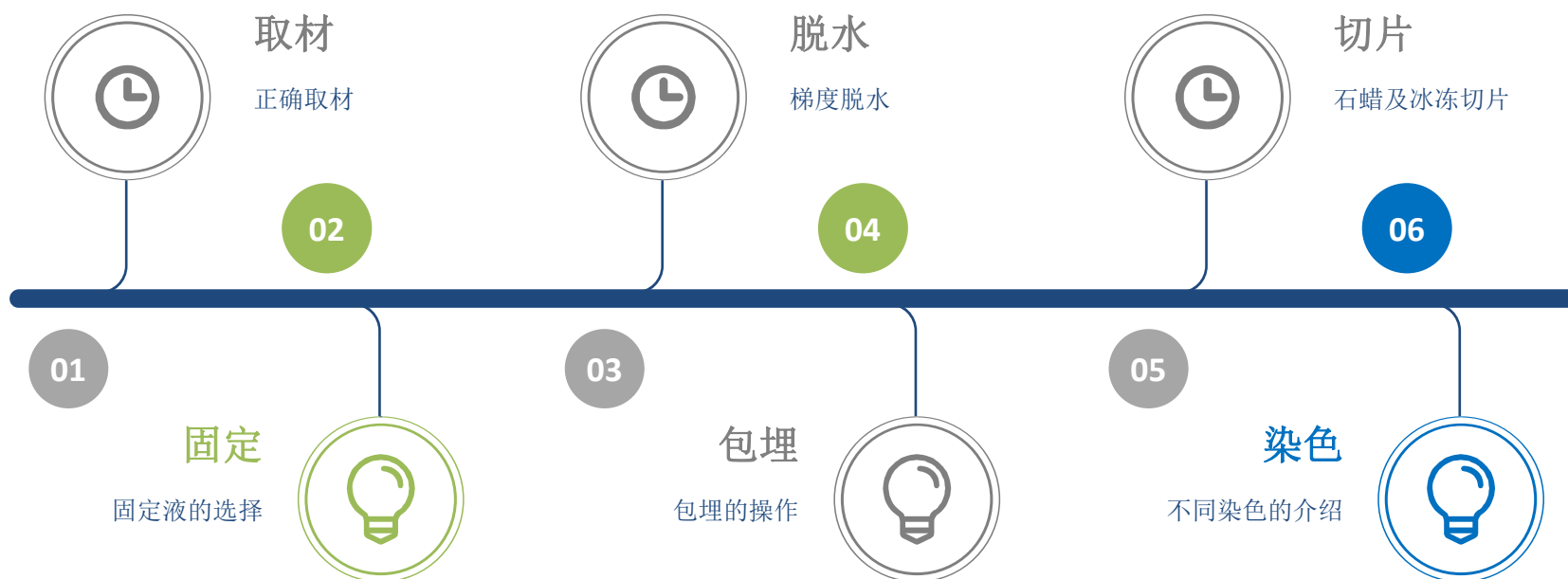
染色方法介绍

• Part three •

• • • •



实验流程

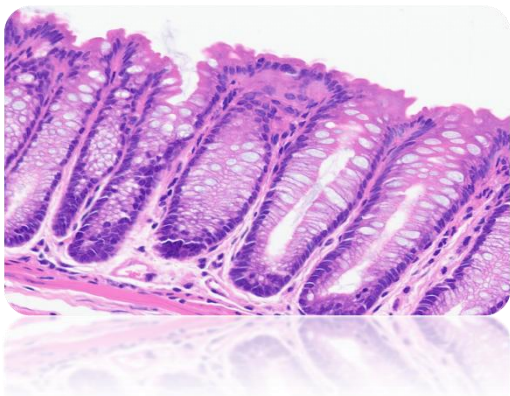




重要染色类型

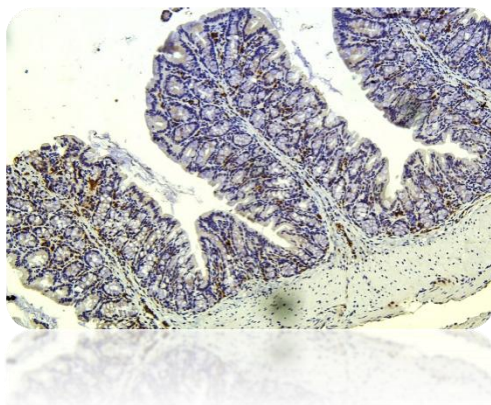
HE染色

观察组织病变



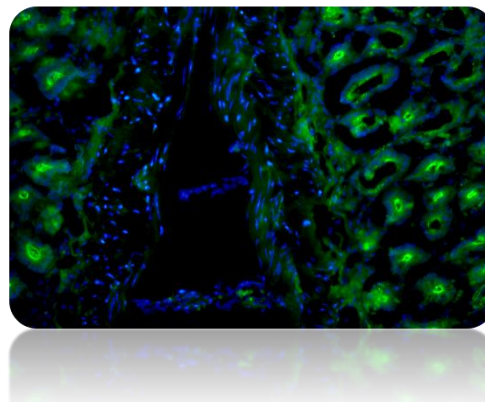
免疫组化

观察蛋白表达及定位



免疫荧光

观察蛋白定位及共定位





概念

苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-Eosin Staining)，简称HE染色法，石蜡切片技术里常用的染色法之一。

原理

苏木精染液为碱性，可以将嗜碱性结构（如核糖体、细胞核及细胞质中的核糖核酸等）染成蓝紫色；伊红为酸性染料，可以将嗜酸性结构（细胞质的大部分结构）染成粉红色。

应用

广泛应用于组织学、胚胎学和病理学方向，用于检测细胞凋亡、坏死，炎症浸润及肿瘤发生等。

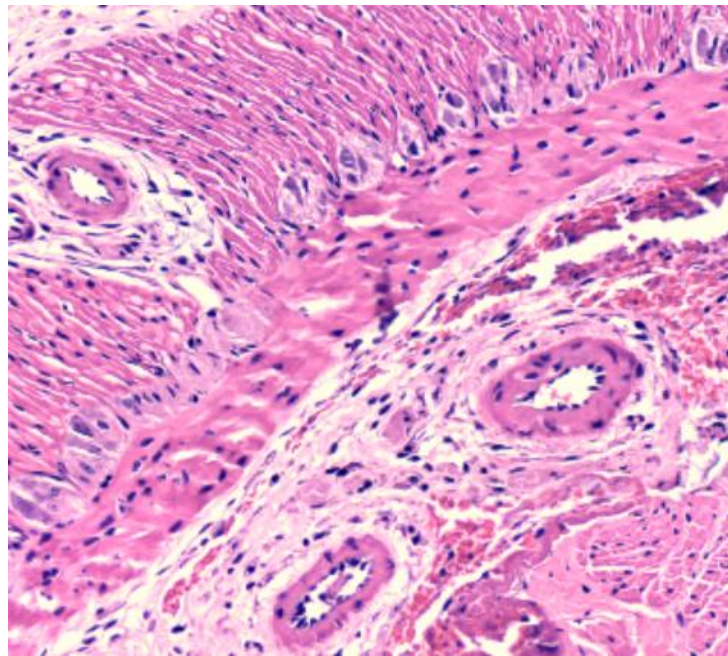
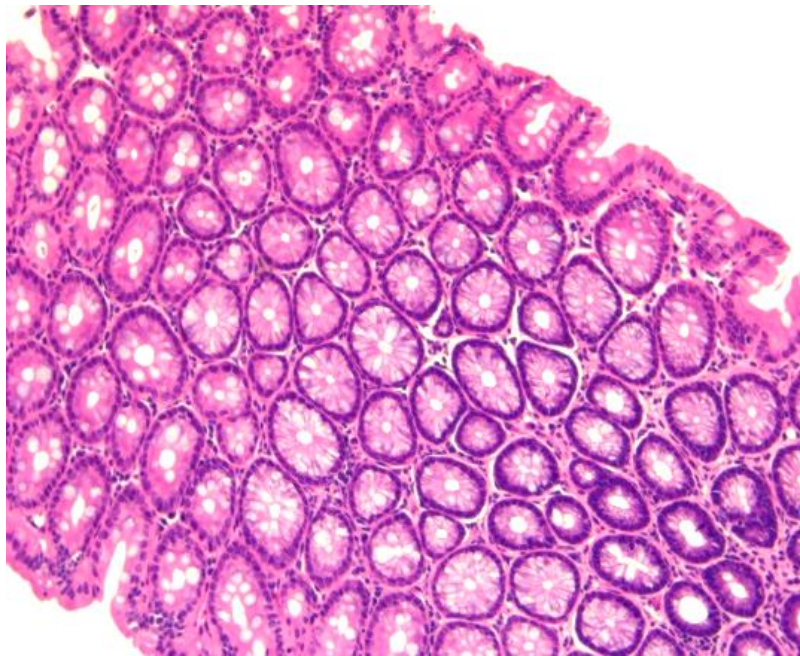


HE染色步骤

- 脱蜡至水：通过二甲苯来溶解切片中的石蜡，再使用浓度梯度下降的酒精来置换二甲苯，使切片复水。
- 苏木素染色：时间可以调控，根据不同组织不同样本进行修改。
- 分化、反蓝：使用盐酸酒精分化和弱碱性溶液反蓝，可以使细胞核清楚着色。
- 伊红染色：时间可调控，使胞浆的各种不同成分又呈现出深浅不同的粉红色。
- 脱水封片：通过浓度梯度上升的酒精脱水，然后经过二甲苯透明，最后使用中性树脂封片，用于显微镜下观察。



HE染色结果



注意事项

- 使用盐酸酒精分化需控制好时间，一般几秒即可，时间过久容易导致苏木素着色不良；
- 需要根据不同组织和实验来摸索最佳染色时间；
- 封片时轻轻放下盖玻片，速度要慢，否则容易产生大量气泡。



免疫组织化学

概念

带显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应，对相应抗原进行定性、定位、定量测定的一项新技术。

原理

根据抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂（酶、金属离子、同位素）显色来确定组织内抗原（多肽和蛋白质）。

应用

广泛应用于各种领域。

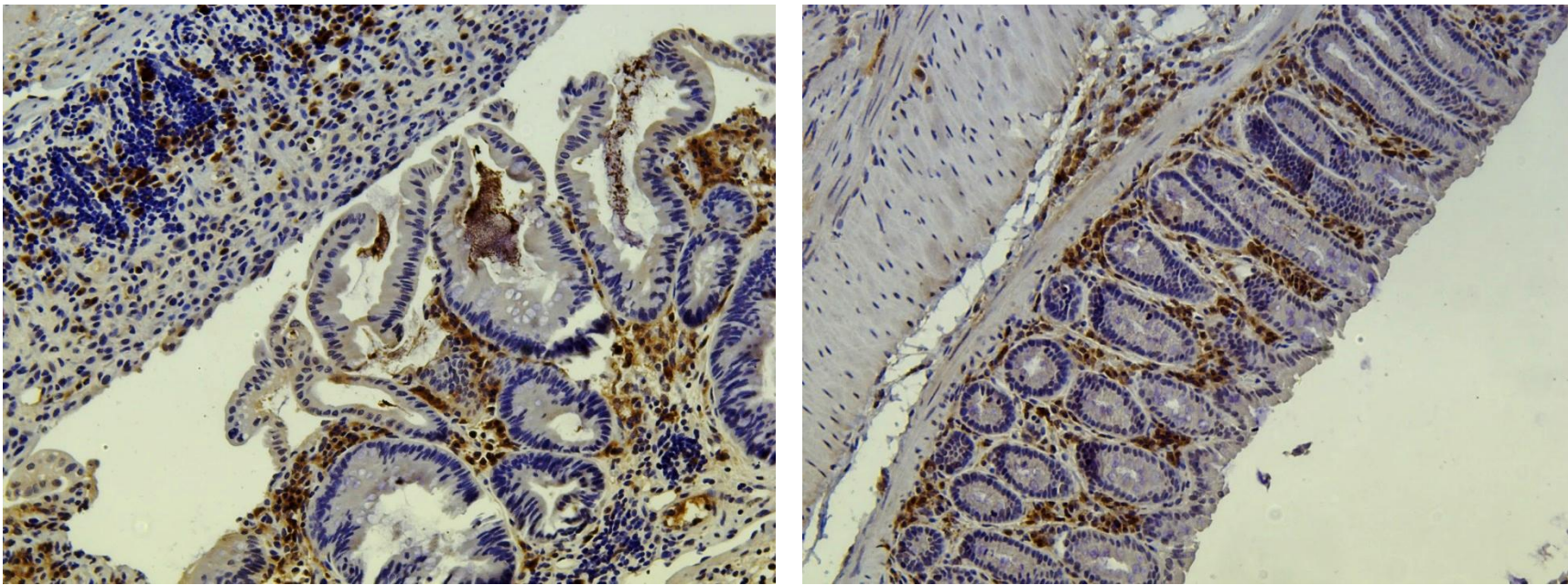


免疫组化步骤

- 脱蜡至水：通过二甲苯来溶解切片中的石蜡，再使用浓度梯度下降的酒精来置换二甲苯，使切片复水。
- 抗原修复：甲醛固定过程中使蛋白之间互相交联而屏蔽了抗原位点，使用多种修复方法来打开被屏蔽的位点。
- 封闭：过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，BSA用于封闭非特异性抗原。
- 抗体孵育：与常规的Western blot抗体孵育一致，一抗推荐过夜。
- DAB染色：辣根过氧化物酶与过氧化氢反应释放氧气，氧化二氨基联苯胺，形成不溶于水的金黄色沉淀。
- 苏木素染色：时间可以调控，根据不同组织不同样本进行修改。
- 脱水封片：通过浓度梯度上升的酒精脱水，然后经过二甲苯透明，最后使用中性树脂封片，用于显微镜下观察。



免疫组化结果



注意事项

- 不同抗体的DAB孵育时间需要预实验摸索，如果背景着色重，可以考虑延长过氧化氢和BSA的封闭时间；
- 免疫组化的苏木素染色时间较短，通常10秒左右即可，无需分化；
- 封片时轻轻放下盖玻片，速度要慢，否则容易产生大量气泡。



免疫荧光染色

概念

以荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术称为免疫荧光技术，利用抗原抗体反应进行组织或细胞内抗原物质的定位。

原理

根据抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的荧光素显色来确定组织内抗原（多肽和蛋白质）。

应用

广泛应用于各种领域。

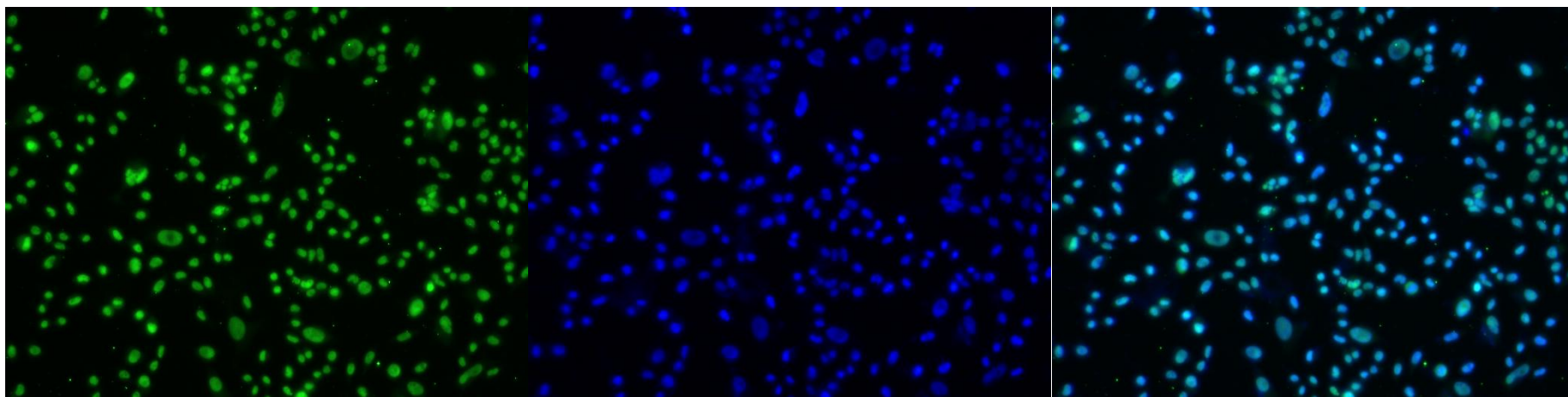


免疫荧光染色步骤（冰冻切片）

- 固定：在切片盒内倒入4%多聚甲醛，放入冰冻切片，室温固定15min。
- 通透：用一定浓度的TritonX-100（TBST稀释）室温孵育10min。
- 封闭：使用10%的血清用于封闭非特异性抗原。
- 抗体孵育：与常规的Western blot抗体孵育一致，一抗推荐过夜。
- 核染色：使用DAPI染液，室温染5-10min，或者是直接用含DAPI的封片剂进行封片。
- 封片：滴加防淬灭封片剂封片，用于荧光显微镜下观察。



免疫荧光染色结果



注意事项

- 冰冻切片如果使用丙酮固定，可以无需进行透膜步骤；
- 免疫荧光从二抗孵育开始需要避光操作，防止荧光猝灭；
- 如果是细胞爬片免疫荧光，封片后可以使用指甲油在玻片周围固定。

04

切片扫描

• Part four •





切片扫描



功能

主要用于对玻片样本进行样本自动全景成像及定量分析。可处理包括HE、MASSON、IHC等标记的组织切片、细胞爬片、TMA等多种样本。

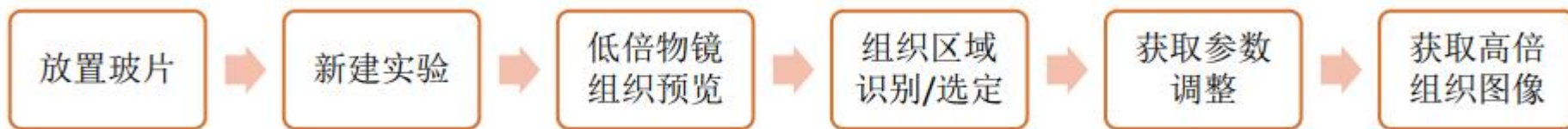


TissueFAXS Plus 全景组织细胞定量分析系统

第五实验楼418房间



扫描流程



放置玻片







新建实验

New Brightfield Experiment

Create Brightfield Experiment

Templates

- BF 20x
- BF 40x
- FL 40x DAPI FITC ALEXA

Identification

Name: Administrator 2014-01-08 10-41 B

Storage Folder: D:\TissueFAXS Projects

Comment:

Preview and Acquisition Settings

Preview Objective: 2.5x, Air

Acquisition Objective: 20x, Air

Preview Reflector: Tran

Acquisition Reflectors:

Reflector	Camera Profile	Color
Tran	HXG40c / Color / 0185231...	☒

Camera Profile: HXG40c / Color / 0185231112_2...

Preview Settings...

Camera: HXG40c / Color / 0185231112

Slides

ID	Name	Acquire	All	Content type	Comment
1	Slide 1	☒	☒	Generic	
2	Slide 2	☒	☒	Generic	
3	Slide 3	☒	☒	Generic	
4	Slide 4	☒	☒	Generic	
5	Slide 5	☒	☒	Generic	
6	Slide 6	☒	☒	Generic	
7	Slide 7	☒	☒	Generic	
8	Slide 8	☒	☒	Generic	

From Existing Experiment...

Custom BF

Custom FL

Hardware Profile: Use current settings

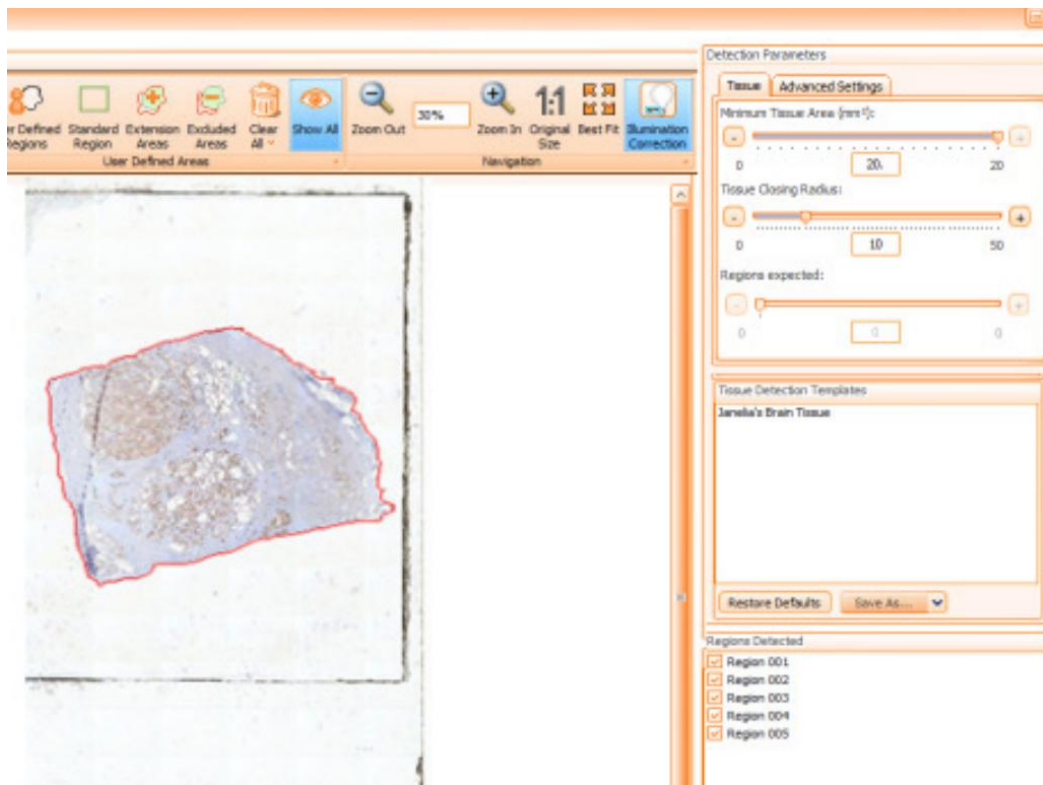
Acquire

Create Only

Cancel



区域选定



Minimum Tissue Area

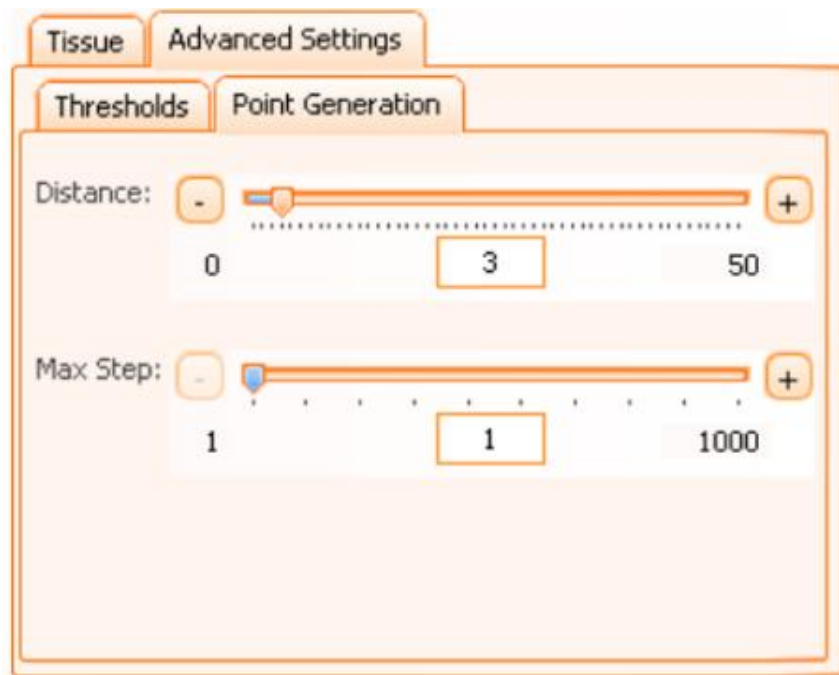
Tissue Closing Radius

Minimum Tissue Area: 当组织较小，未被识别到时，可调小该值；识别到杂质时，可调大。

Tissue Closing Radius: 增大该值，距离较近（不接触）的两块组织会被识别为一个 region，减小该值，可使距离较近（不接触）的两块组织识别为不同的 regions。



区域选定

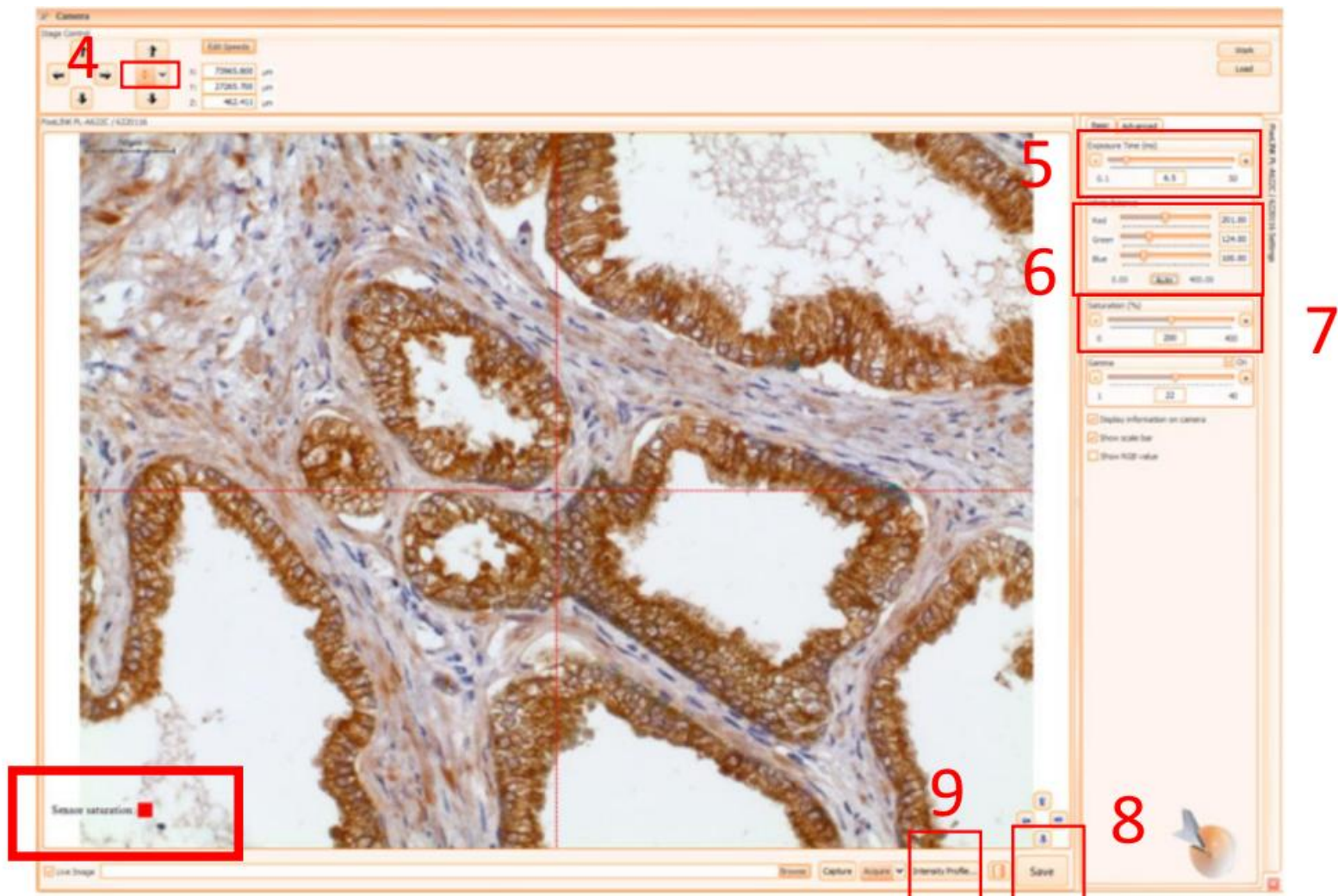


调整轮廓离组织边缘距离，数值越大，距离越大。

调整软件识别过程中虚拟点间的间距，距离越小，轮廓精确度越高。



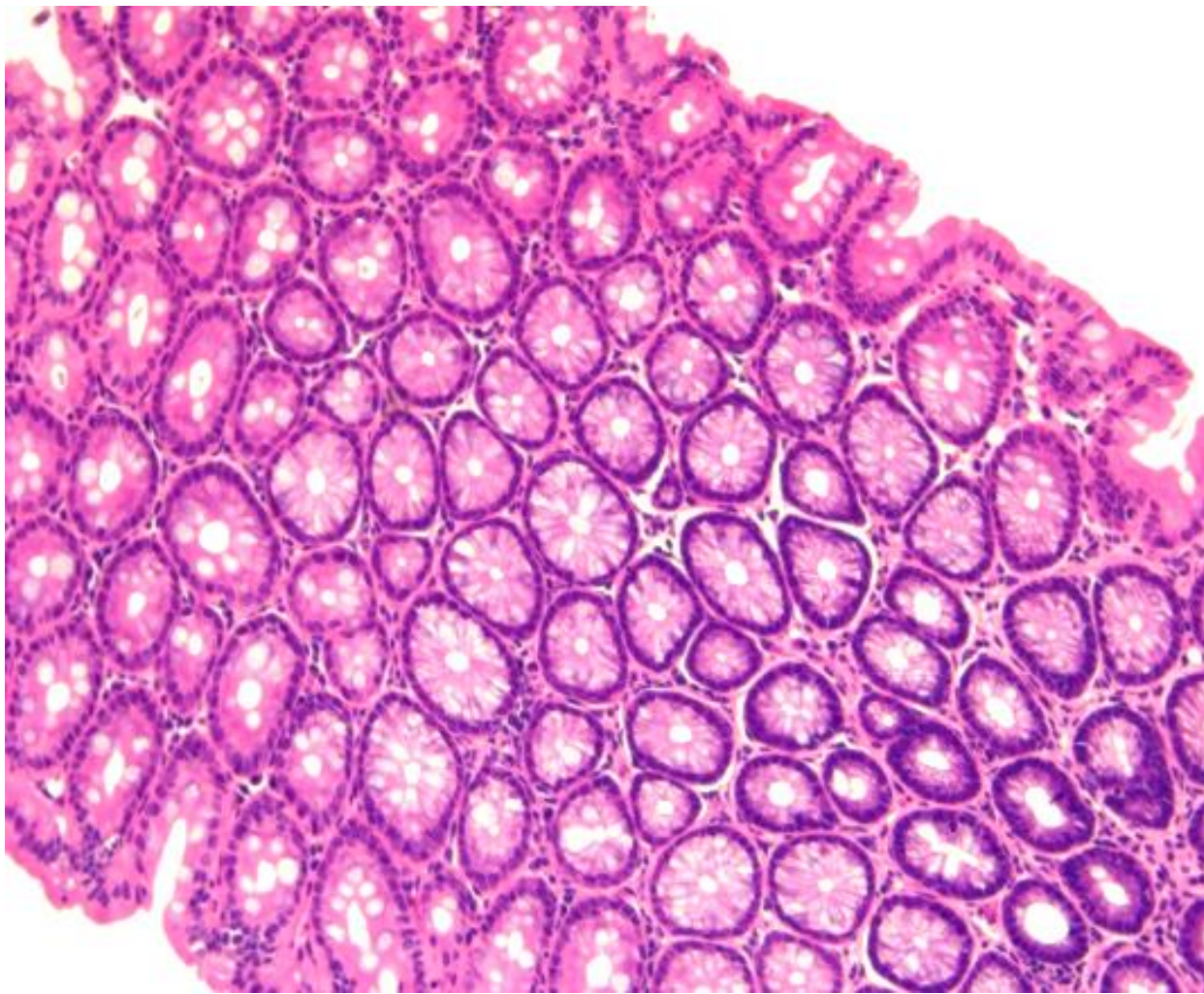
参数调整



4: 调整焦距 5: 调整曝光时间 6: 调整白平衡 7: 调整色彩饱和度



获取高倍图像



免疫组织化学染色结果判读

肖秋香

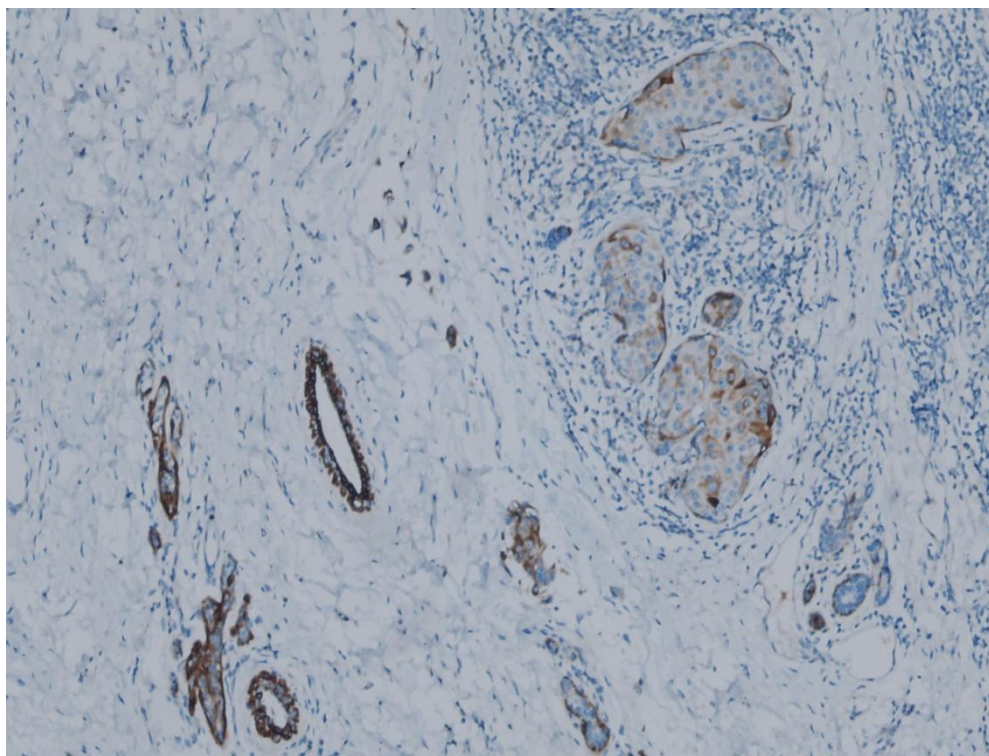
注意事项:

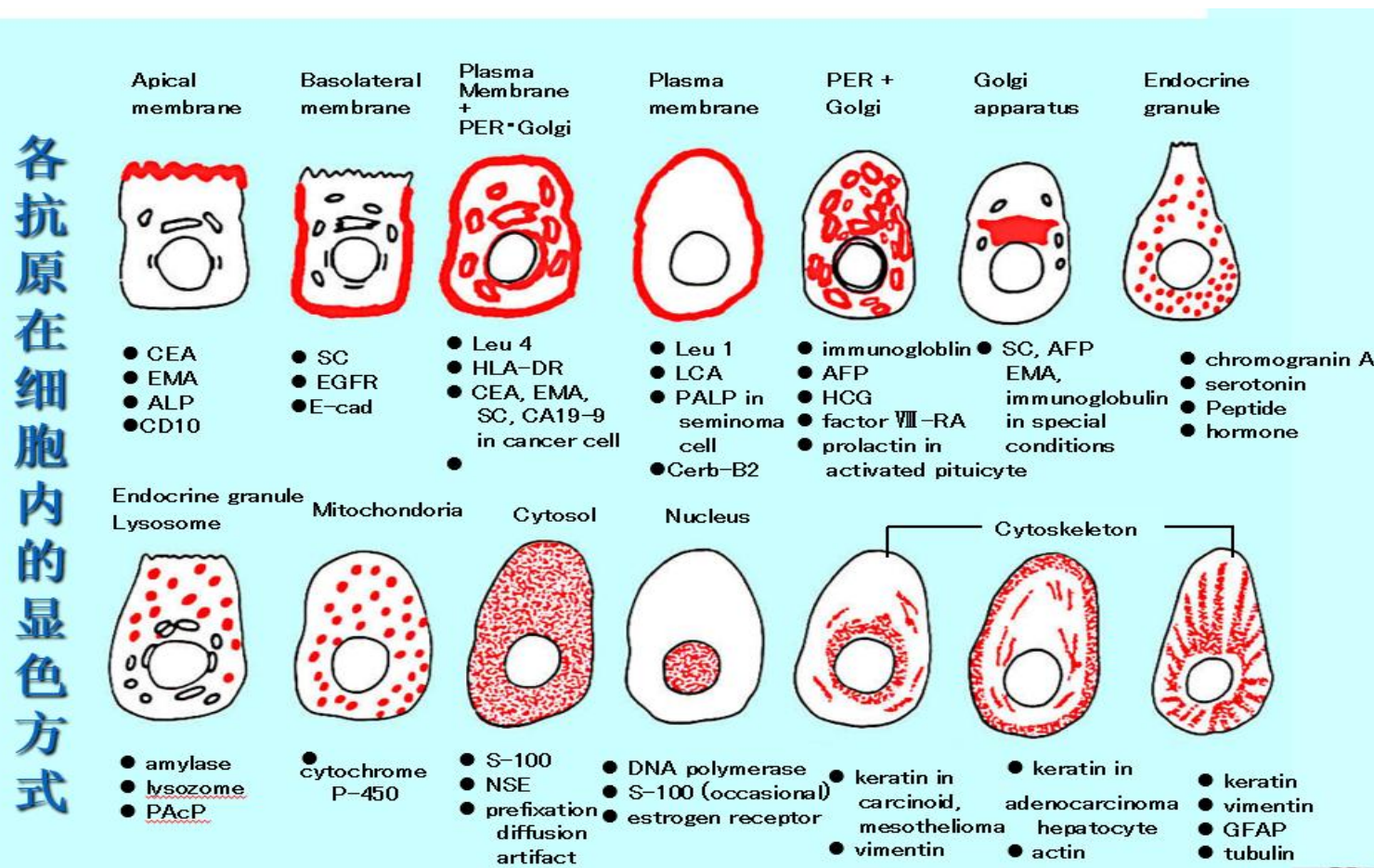
1. 必须**设置对照**，包括阳性对照、阴性对照、内对照；
2. 抗原表达的**特定部位**，不在抗原所在部位的着色，视为阴性；
3. 阴性结果不能视为抗原不表达；
4. 尽量**避免评估出血、坏死及切片刀痕和组织边缘细胞的阳性表达**，这类**阳性着色多系内源干扰，或系人为因素所致**；



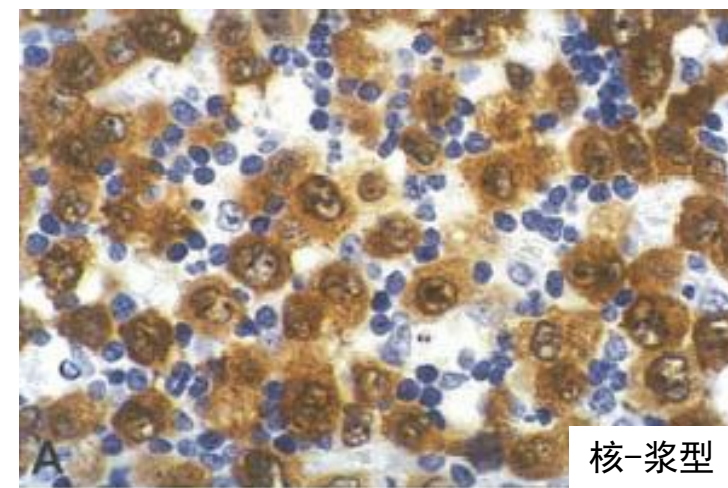
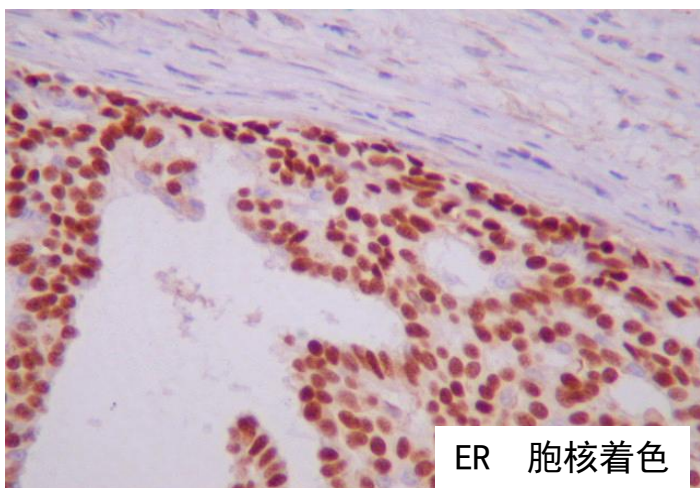
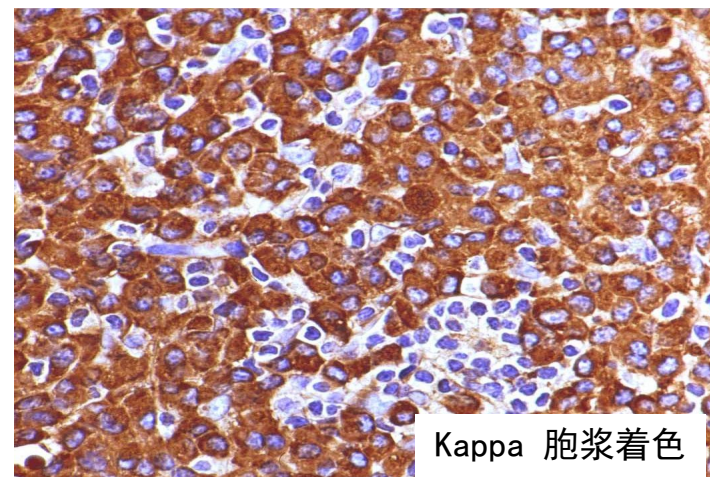
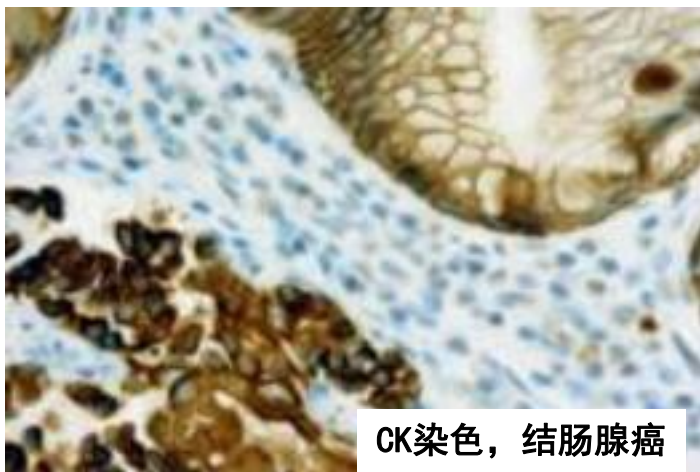
结果判读步骤

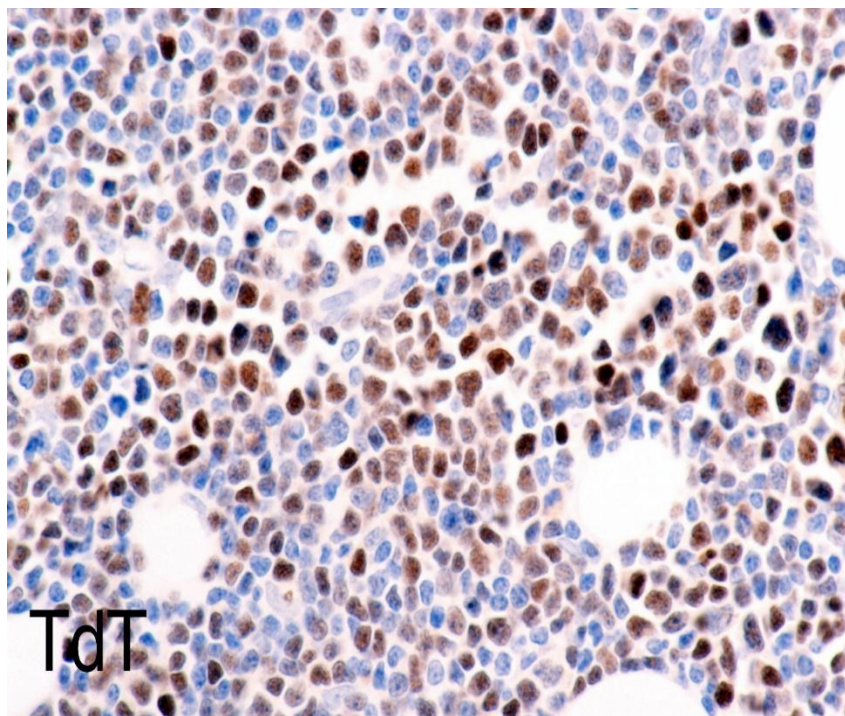
- 1、判断染色是否成功，比较**对照组**
- 2、判断着色细胞类型，结合HE染色切片确定反应阳性细胞是否为**目标细胞**
- 3、判断着色的亚细胞定位
 - 胞膜型
 - 胞核型
 - 胞质型
 - 膜-质型
 - 核-质型



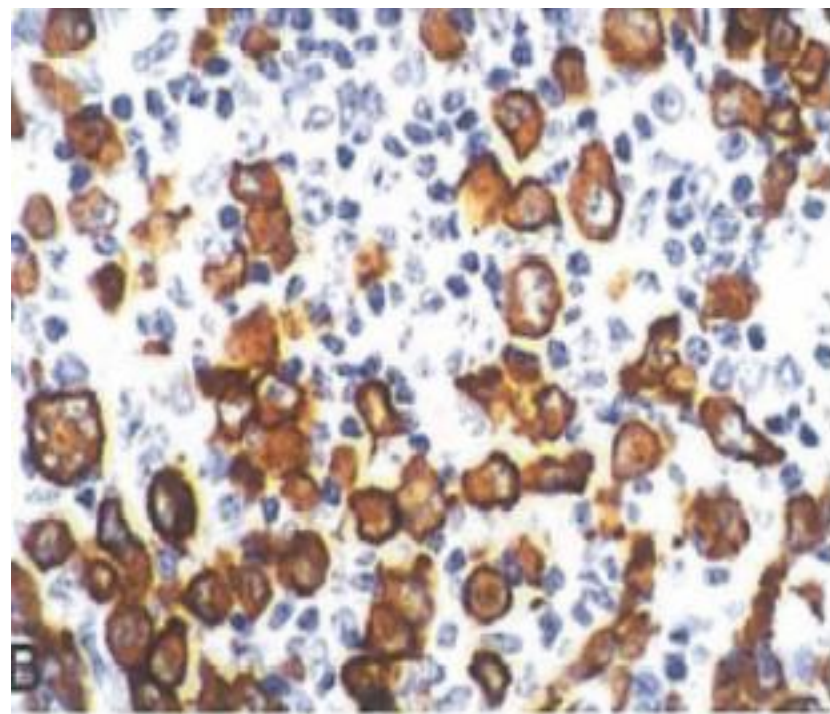


抗原在肿瘤细胞中的定位





TdT染色，胞核着色



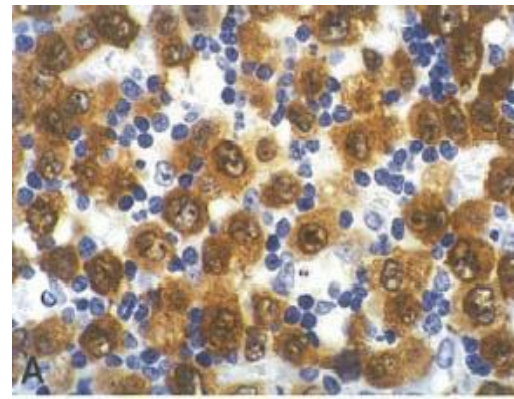
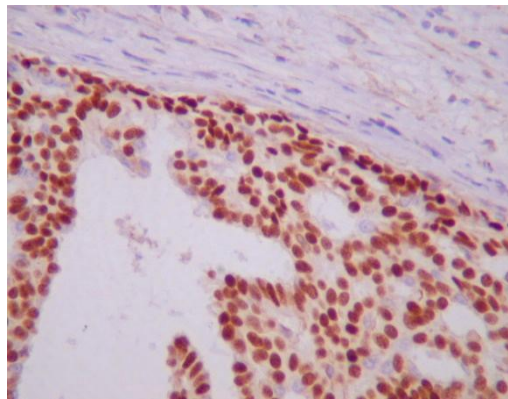
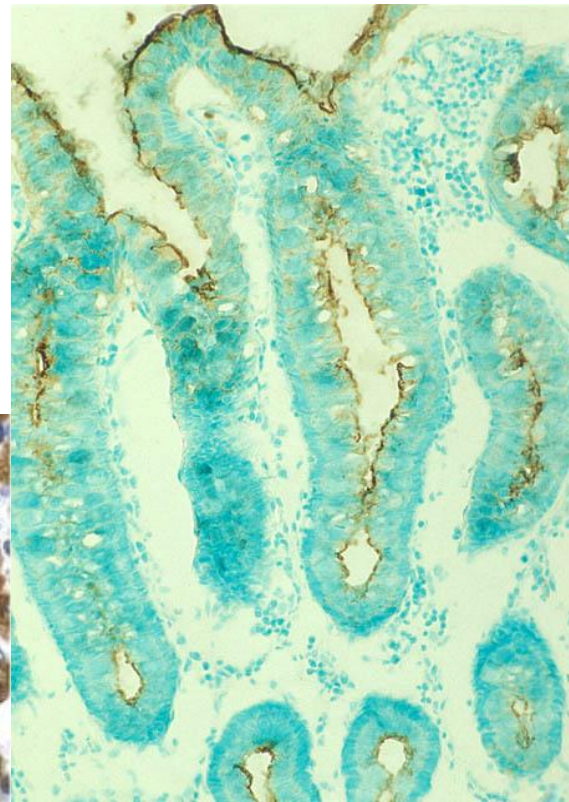
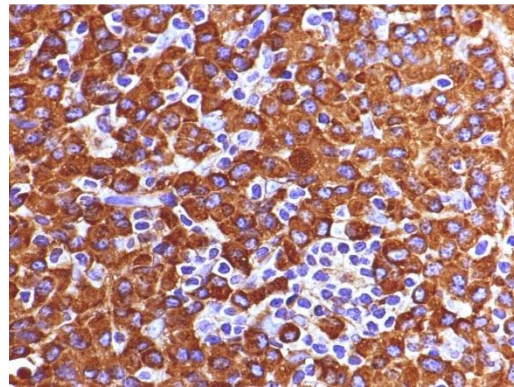
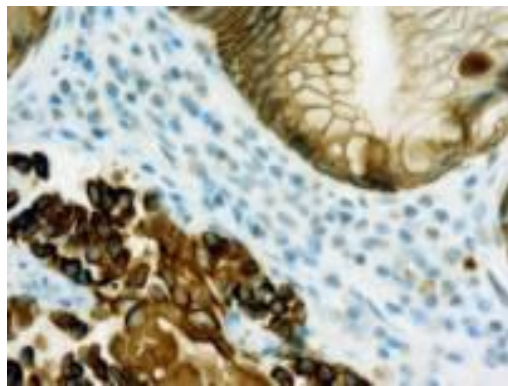
膜-浆型

结果判读

4、阳性细胞组织学分布

- **局灶型** 阳性肿瘤细胞呈不规则小灶性分布
- **弥漫型** 阳性细胞呈弥漫性分布、细胞间无连接，也可以单个细胞散在分布
- **网状型** 主要见于细胞密度较大的大细胞，且标记物多为膜抗原
- **腔缘型** 阳性颗粒主要位于腺癌腔缘的微绒毛

抗原在肿瘤细胞中的定位



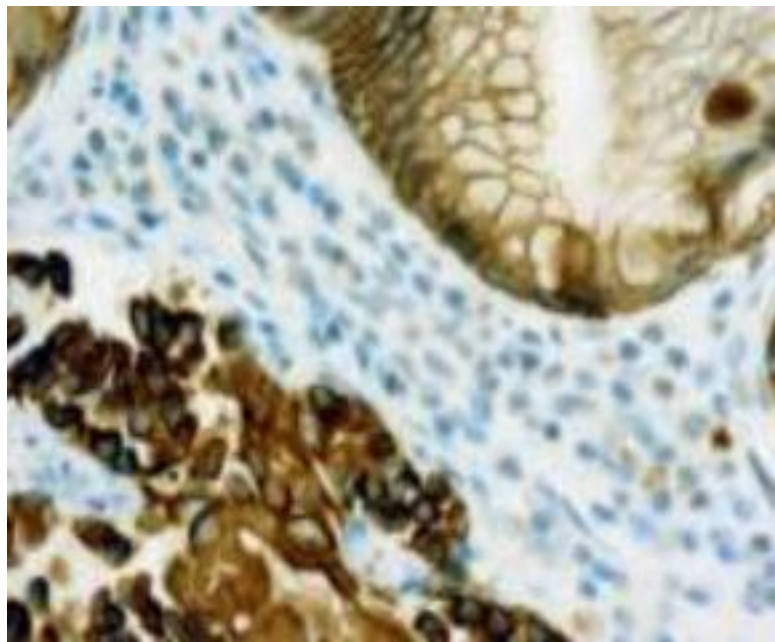
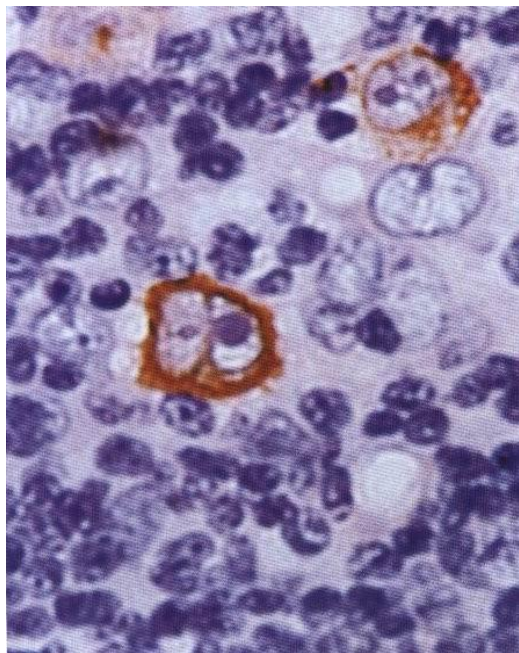
结果判读

5、标志物阳性程度的判断

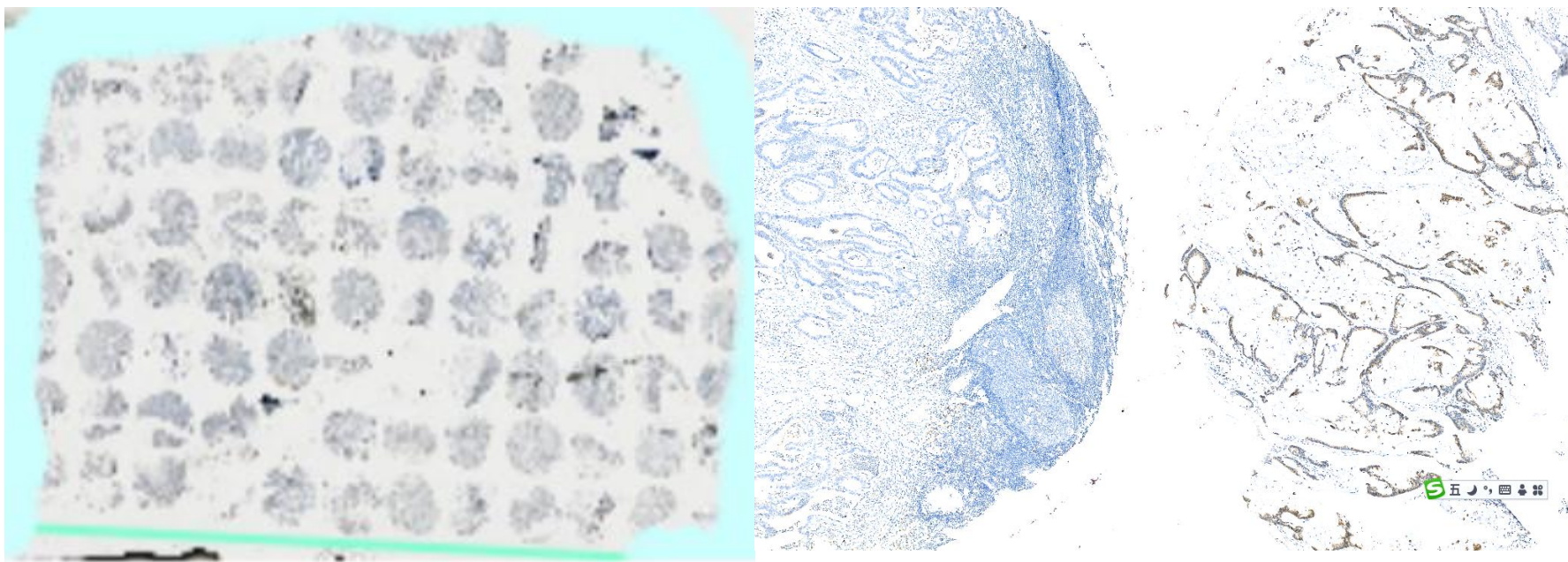
阳性着色程度	阳性细胞数量
弱阳性 (+) --- 1分	弱阳性 (+, 指阳性细胞数在 25%以下) --- 1分
中等阳性 (++) --- 2分	中等阳性 (++, 指阳性细胞数在 25%-49%) --- 2分
强阳性 (+++) --- 3分	强阳性 (+++, 指阳性细胞数在 50%以上) --- 3分

目前多采用**积分综合计量**，计算公式：**两者相乘（或相加）**。至少随机（热点）观察**5-10个HPF**，取其平均值。

目标细胞： 阳性着色程度 $\times$ 阳性细胞数量



组织芯片

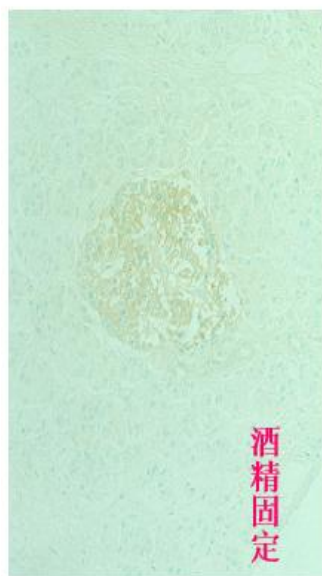


假阳性和假阴性

假阴性：

- 抗体已失活或浓度不当或抗体本身达不到应有的敏感度；
- 抗原已被分解破坏或含量过低，当标本处理不当时更容易出现，如固定不良、温度过高；
- 抗原被遮盖：由于醛类固定剂的使用；
- 技术操作失误，如反应时间不够等。

假阴性：注意内对照

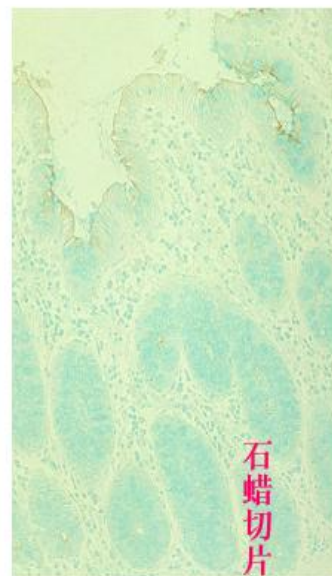


酒精固定

胰腺, insulin

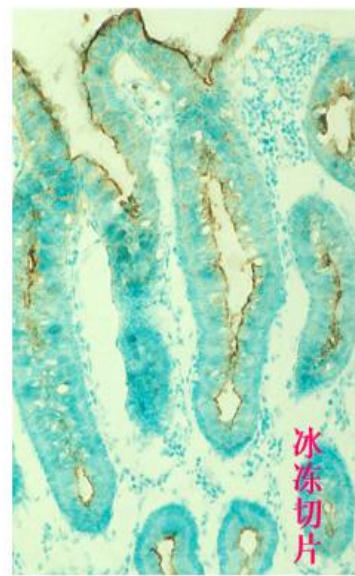


福尔马林固定



石蜡切片

结肠, CEA



冰冻切片

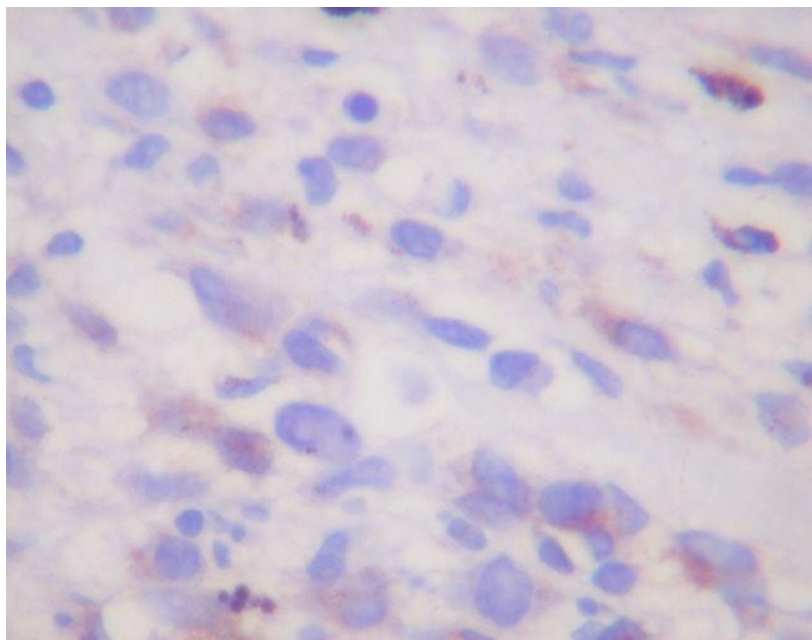


气泡影响抗体抗体反应

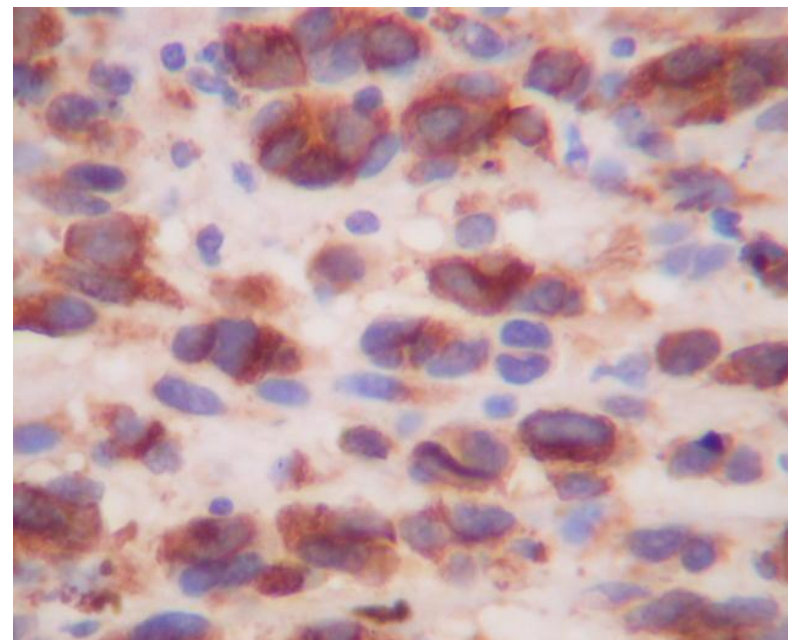
平滑肌肉瘤SMA

假阴性

Mart-1染色

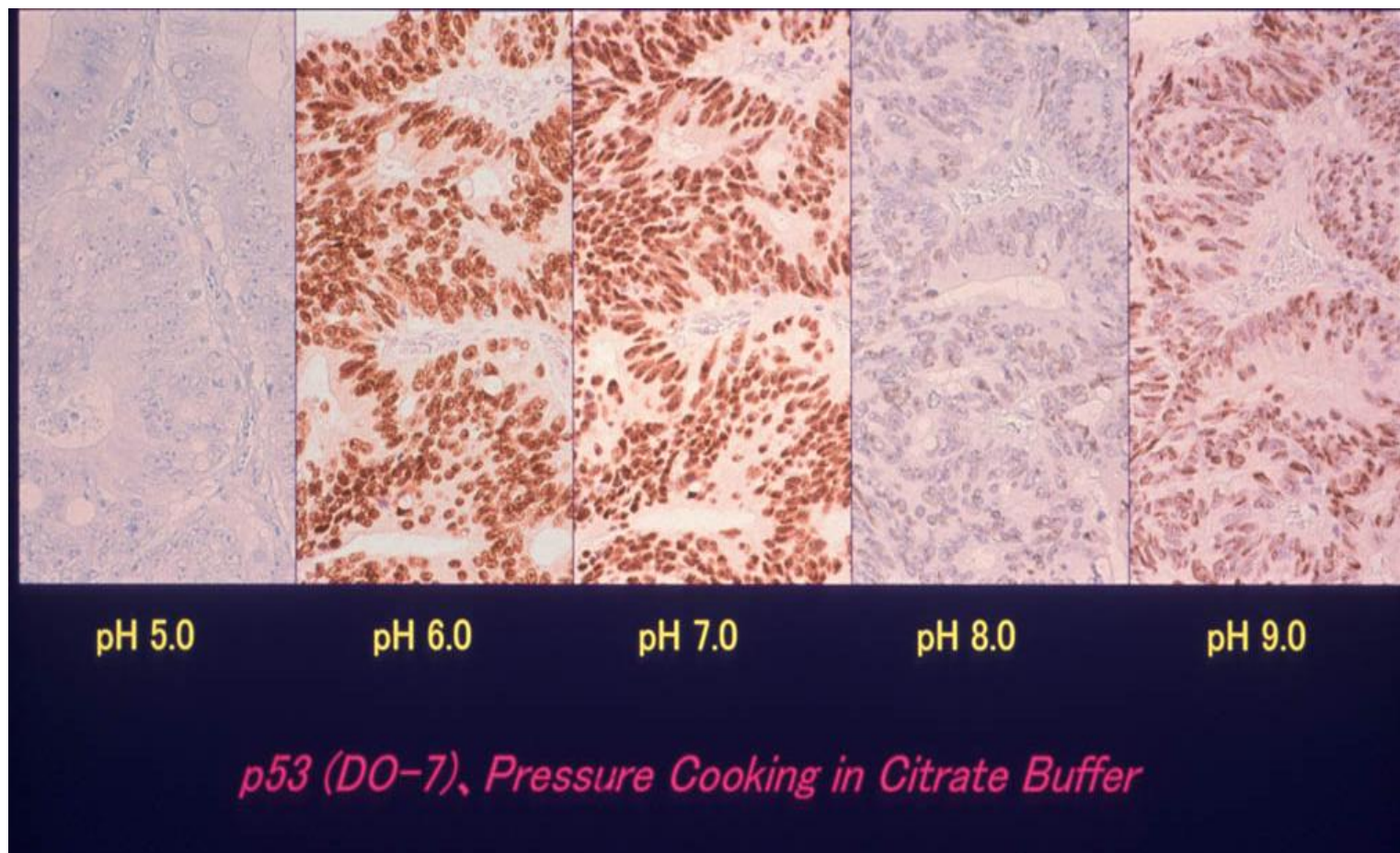


未修复



修复

假阴性

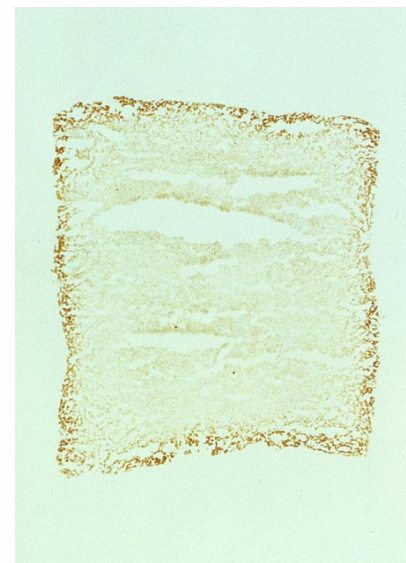
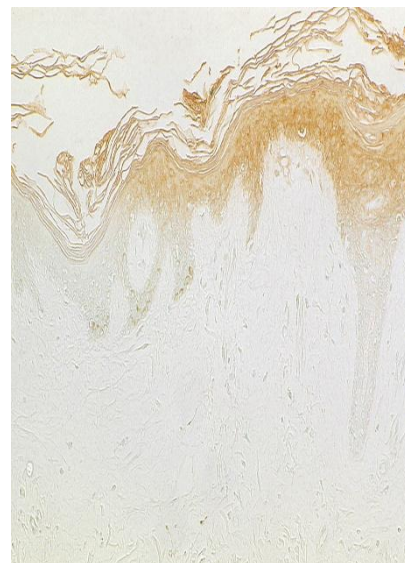
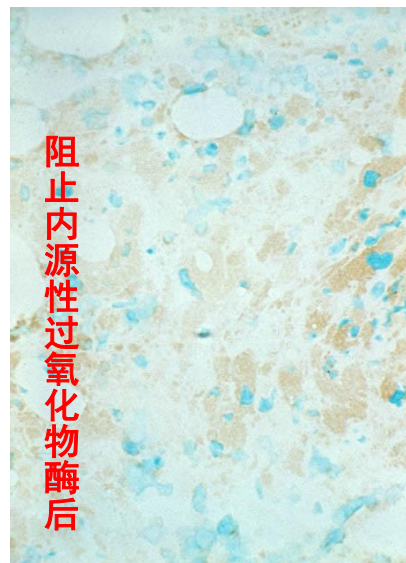
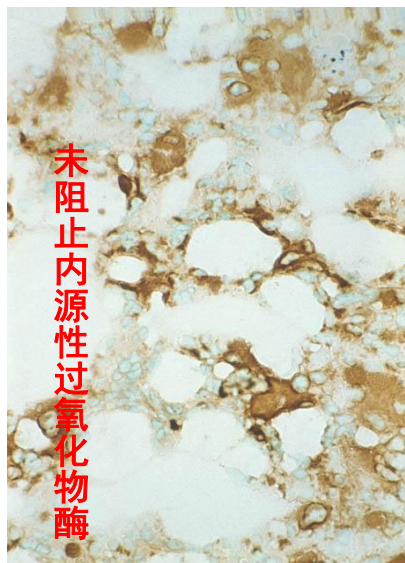


假阳性和假阴性

假阳性：

- 抗体与多种抗原有交叉反应；
- 抗体与组织中某些成分的非特异性结合；
- 内源性过氧化酶的显色；
- 肿瘤或病变中有其他组织残留
- 抗原的弥散或被瘤细胞吞噬而细胞中的免疫球蛋白使抗原在不该出现的部位出现。
- 外源性和内源性色素的干扰。

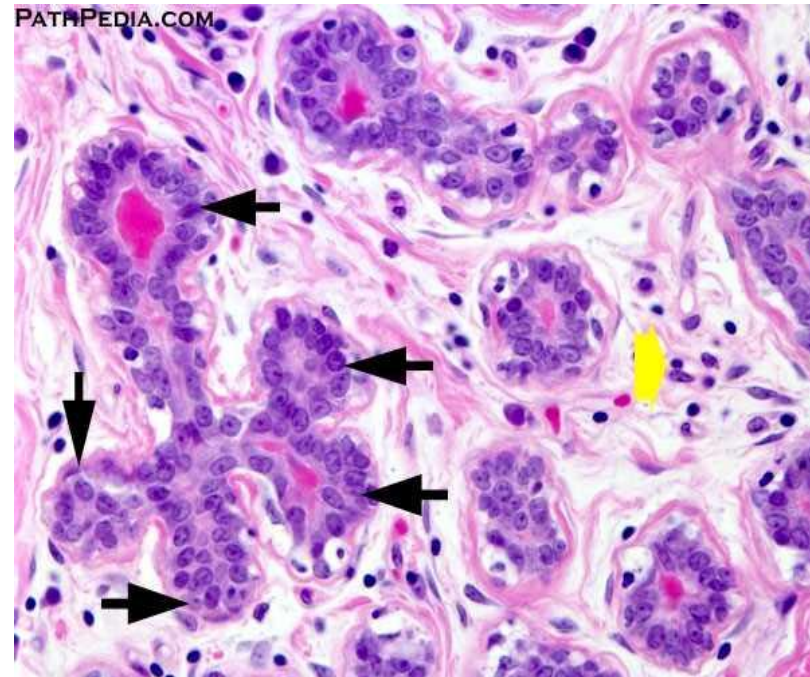
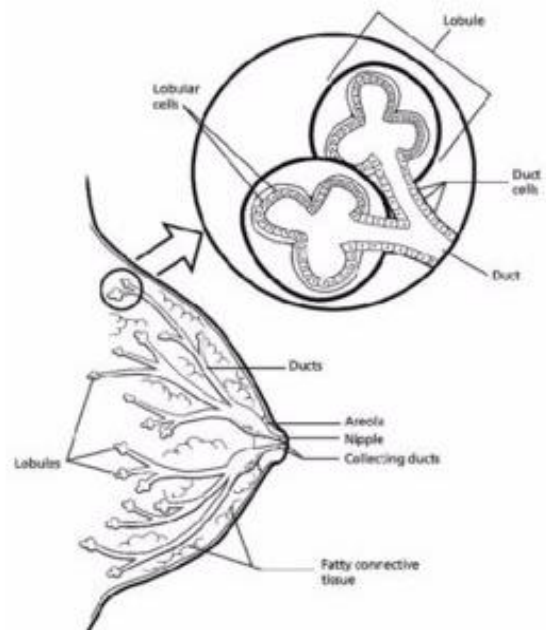
假阳性

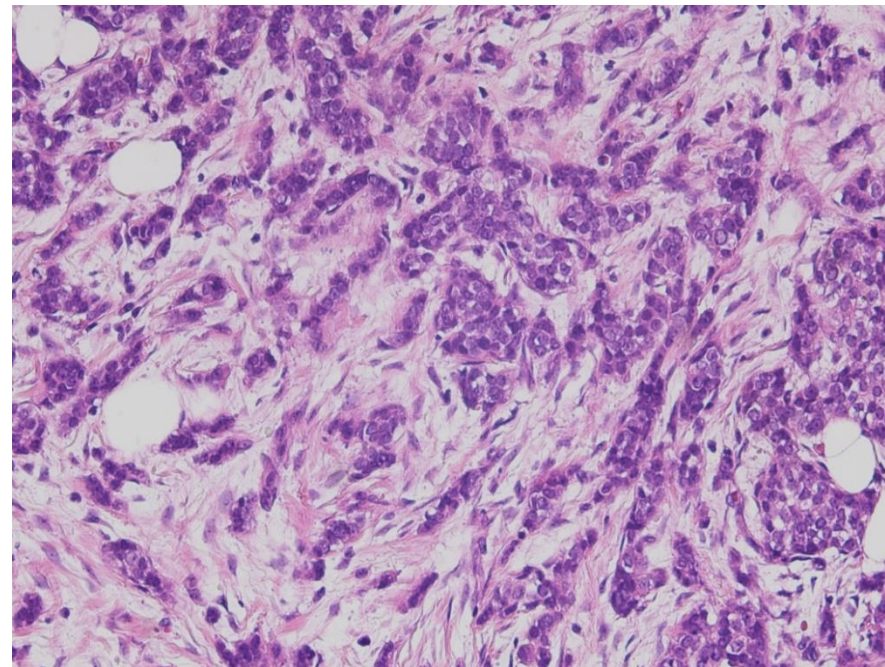
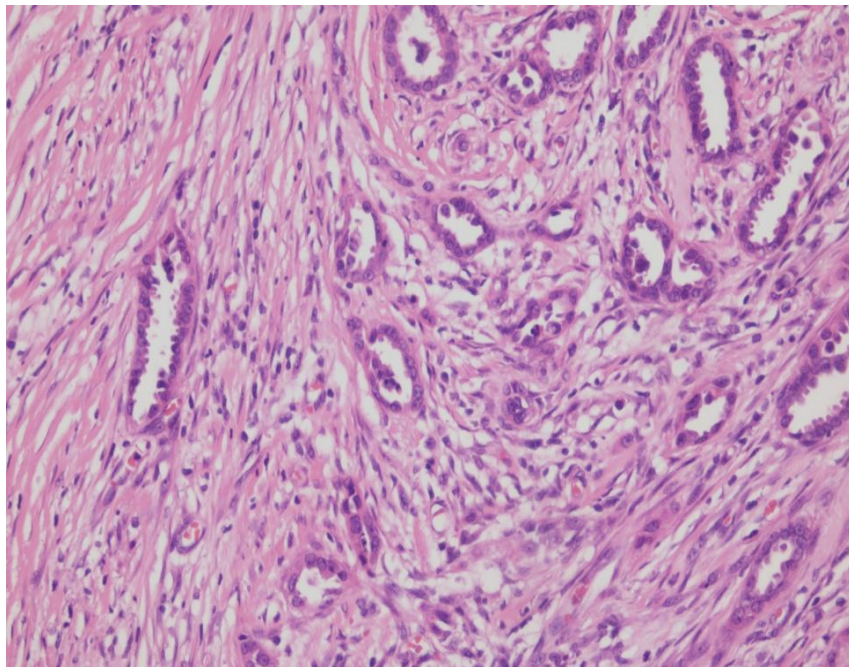


玻片干燥造成的“边缘效应”

应用举例





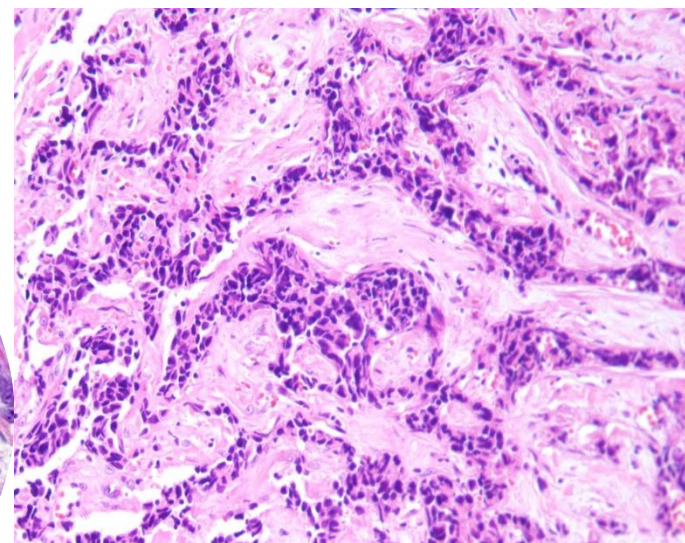
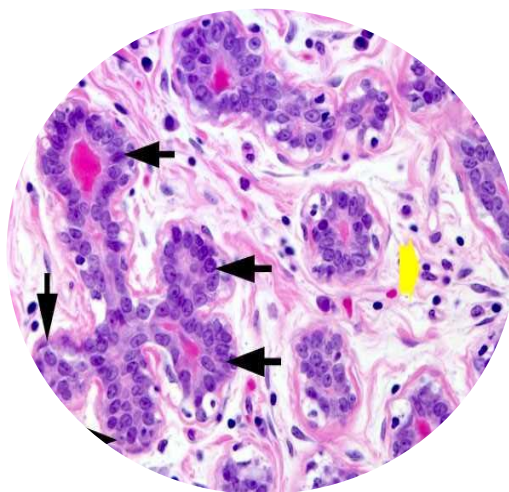
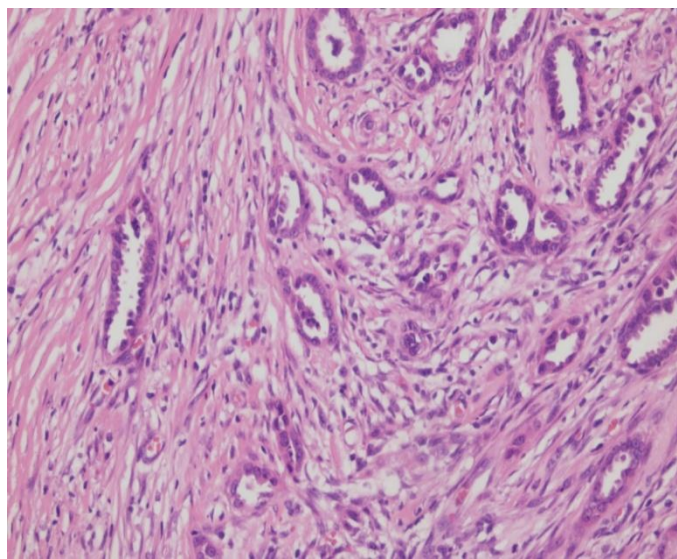


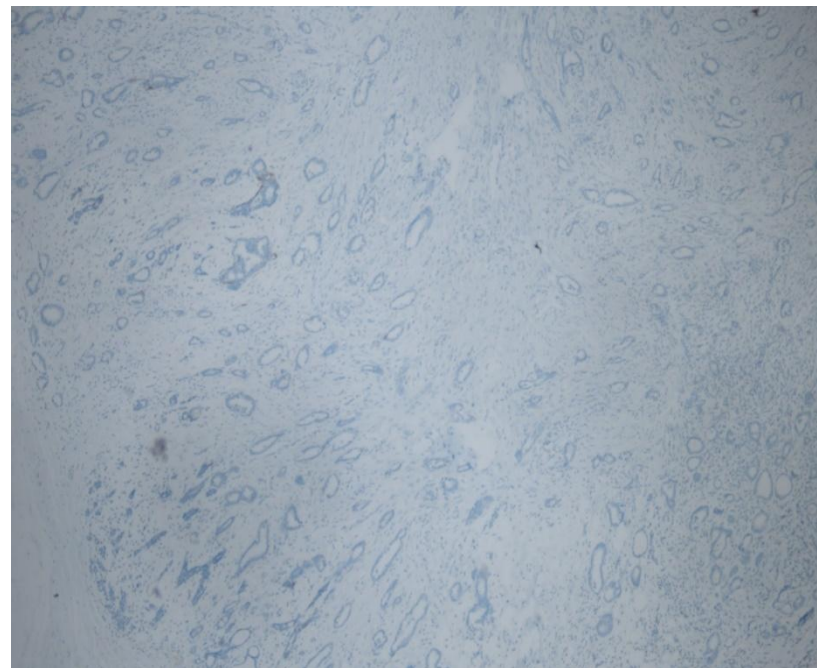
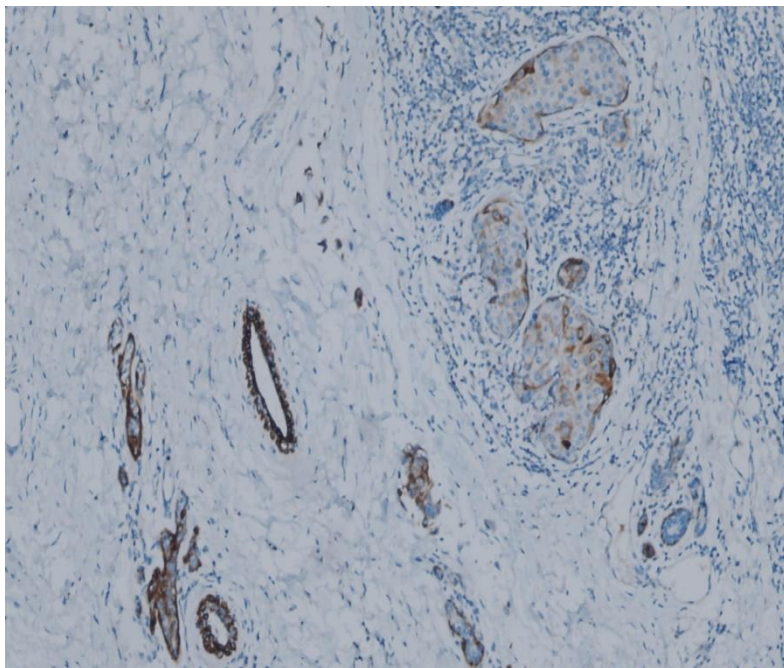
乳腺癌组织学评分标准腺管形成、核异型、核分裂像

腺管形成： >75%为1分； 10%~75%为2分； <10%为3分；

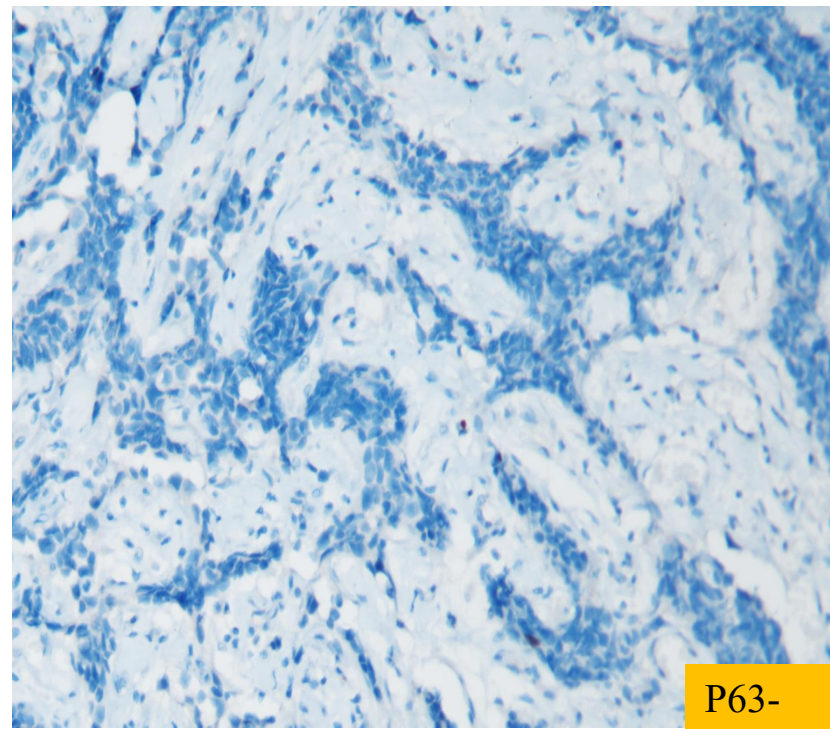
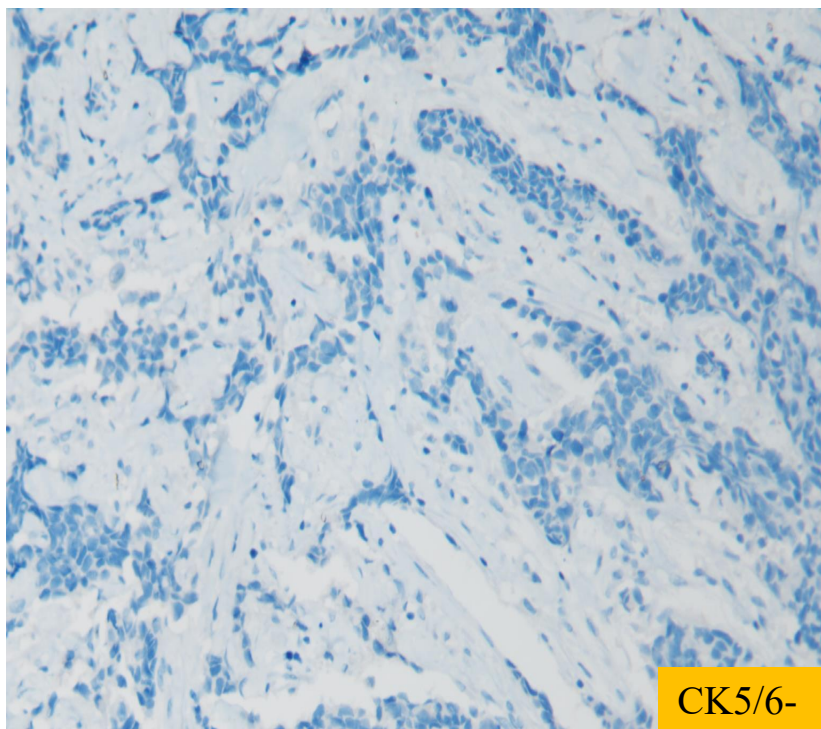
核的多形性： 与肿瘤周围正常乳腺组织比较：细胞规则，核小或稍大为1分；较正常上皮细胞大，有中度异形性，可见空泡核及核仁为2分；瘤细胞明显多形性，可见巨核及畸形核为3分；

核分裂像计数： 在细胞生长活跃区，计数20个高倍视野($\times 400$)，然后算出每10个高倍视野的核分裂像数。0~1个/10HPF为1分；2~3个/10HPF为2分；>3个/10HPF为3分。以上3项相加，总分3~5分为Ⅰ级，低度恶性；6~7分为Ⅱ级，中度恶性；8~9分为Ⅲ级，高度恶性。

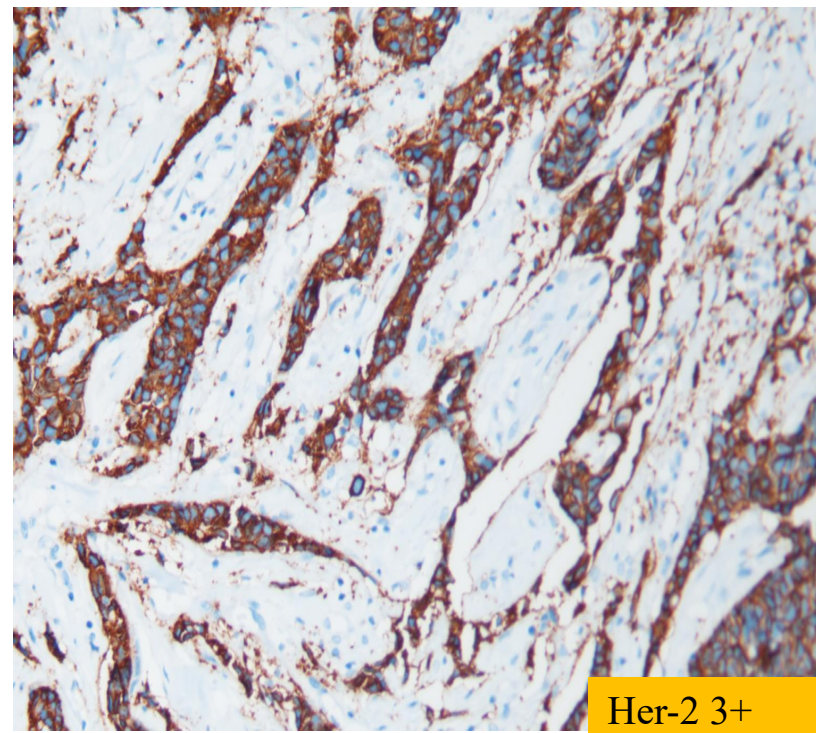
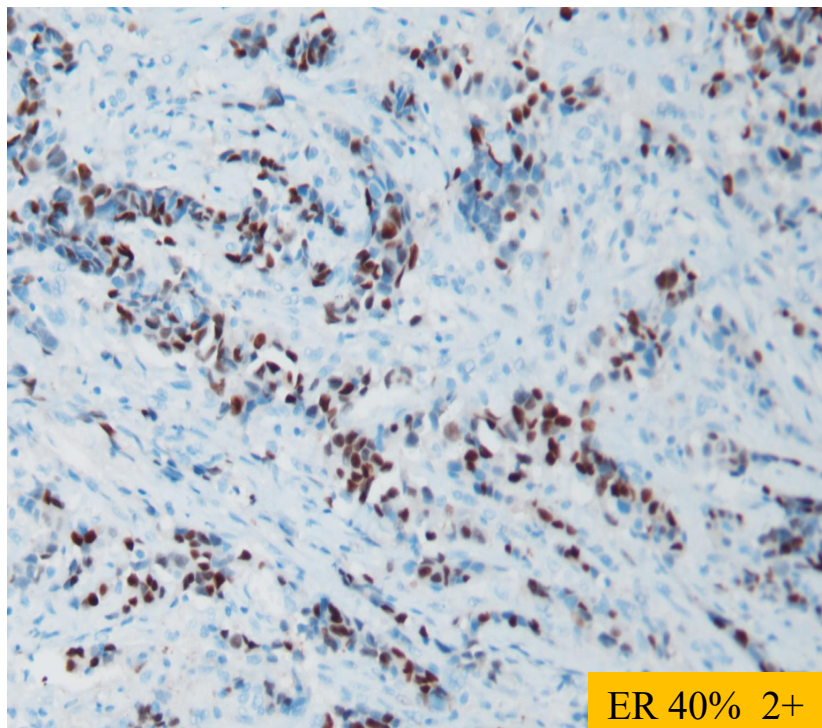


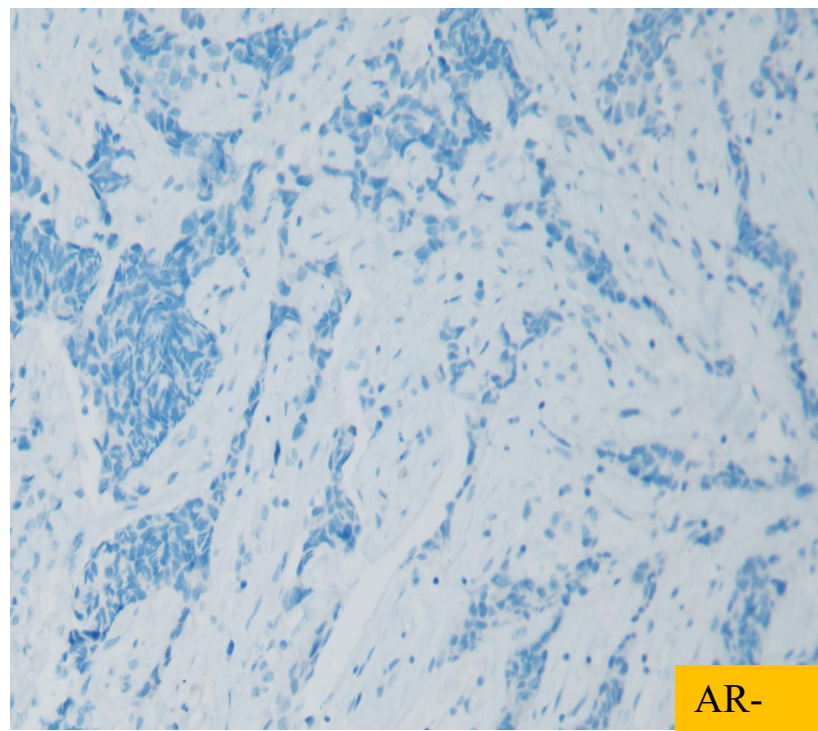
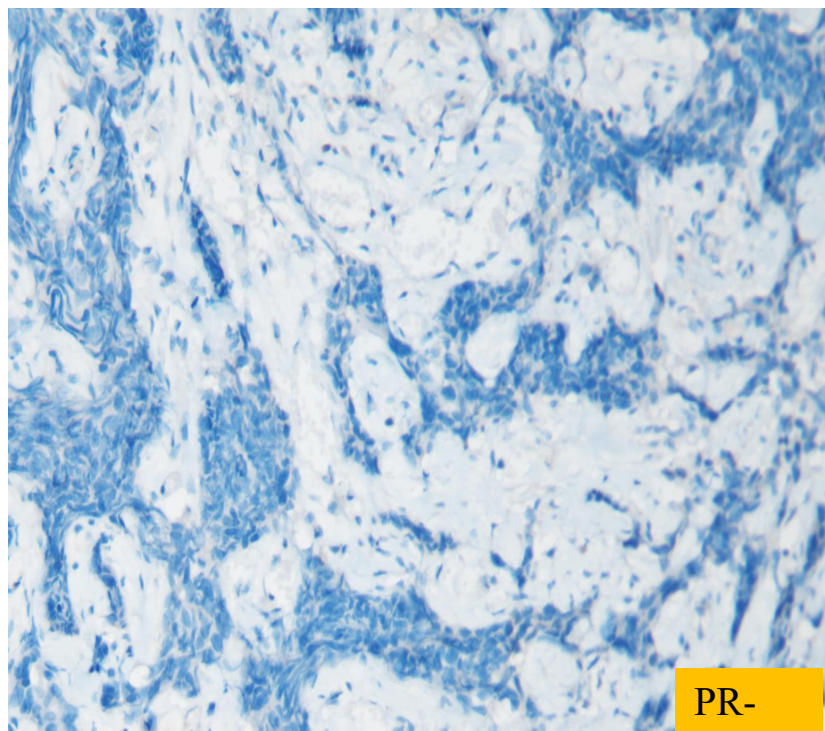


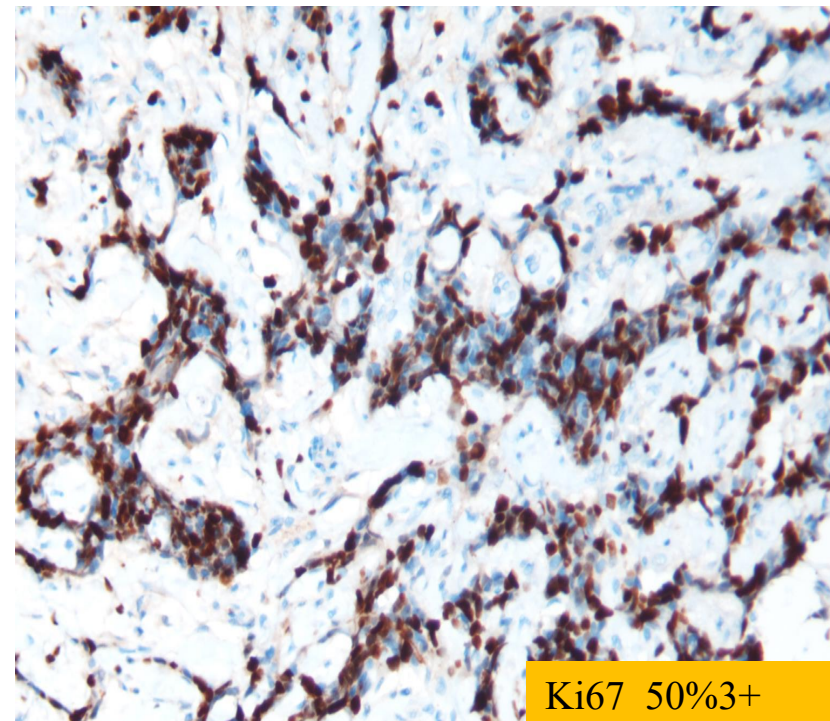
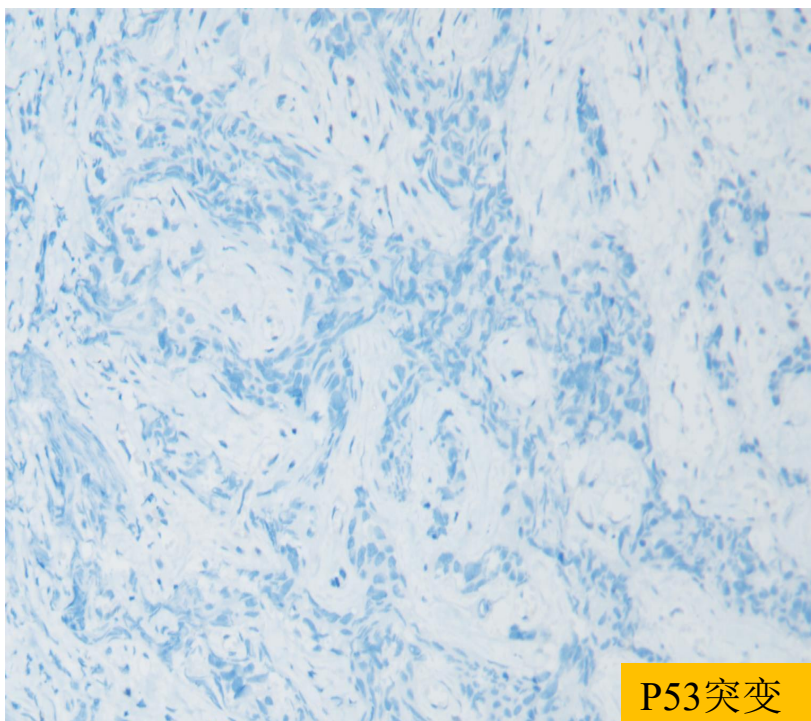
CK5/6



乳腺癌亚型	分子标记	预后	治疗
Luminal A型	ER(+)和/或PR(+), Her-2(-) ; Ki-67低表达 (<14%)	好	内分泌治疗
Luminal B型 (Her-2 阴性)	ER(+)和/或PR(+), Her-2(-) ; Ki-67高表达 (≥14%)	较好	内分泌治疗±化疗
Luminal B型 (Her-2 阳性)	ER(+)和/或PR(+), Her-2(+)	较好	化疗+内分泌治疗+ Her-2 靶向治疗
Her-2型	ER(-), PR(-), Her-2(+)	较差	化疗+Her-2靶向治疗
基底样型	ER(-), PR(-), Her-2(-)	差	化疗







乳腺癌亚型	分子标记	预后	治疗
Luminal A型	ER(+)和/或PR(+), Her-2(-) ; Ki-67 低表达 (<14%)	好	内分泌治疗
Luminal B型 (Her-2 阴 性)	ER(+)和/或PR(+), Her-2(-) ; Ki-67 高表达 (≥14%)	较好	内分泌治疗±化疗
Luminal B型 (Her-2 阳 性)	ER(+)和/或PR(+), Her-2(+)	较好	化疗+内分泌治疗 +Her-2靶向治疗
Her-2型	ER(-), PR(-), Her-2(+)	较差	化疗+Her-2靶向治疗
基底样型	ER(-), PR(-), Her-2(-)	差	化疗

Thank you

